



Universidad Autónoma de Madrid

Programa Doctorado en Biociencias Moleculares

**Potencial efecto hipotensor de esteroides sexuales  
masculinos**

**TESIS DOCTORAL**

Lucía Isidoro García

Madrid, 2018





DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

# **Potencial efecto hipotensor de esteroides sexuales masculinos**

LUCÍA ISIDORO GARCÍA  
Licenciatura en Biología  
Máster Universitario en Genética y Biología Celular

DIRECTORA: DRA. MERCEDES FERRER PARRA  
FACULTAD DE MEDICINA, UAM







Mercedes Ferrer Parra, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

C E R T I F I C A:

Que D<sup>a</sup>. Lucía Isidoro García ha realizado bajo su dirección el trabajo **“Potencial efecto hipotensor de esteroides sexuales masculinos”** como Tesis para alcanzar el Grado de Doctor.

Madrid, a 22 de Enero de 2018

Fdo.: Dra. Mercedes Ferrer



**Potencial efecto hipotensor de esteroides sexuales masculinos.** Esta TESIS fue realizada bajo el convenio de Doble Titulación celebrado por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) con número de registro: 31425-649-29-III-12, entre el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM y el Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y Biotecnología (Biociencias Moleculares) de la UAM, desarrollado en el marco de las actividades de la Cátedra “Isaac Costero”. Esta Tesis fue desarrollada en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la Dirección y Tutoría de la Dra. María Mercedes Perusquía Nava y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UAM bajo la Dirección y Tutoría de la Dra. Mercedes Ferrer Parra.







**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

# **Potencial efecto hipotensor de esteroides sexuales masculinos**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

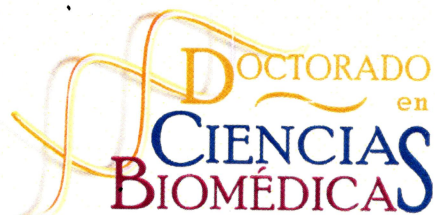
**PRESENTA:**  
**M. en C. LUCÍA ISIDORO GARCÍA**

**DIRECTOR DE TESIS:**  
**DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**  
**DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA**  
**DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**  
**DRA. MERCEDES FERRER PARRA**  
**FACULTAD DE MEDICINA, UAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2018**





La Dra. María Mercedes Perusquía Nava, Investigadora Titular del Departamento de Biología Celular y Fisiología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.,

CERTIFICA:

Que la M. en C. Lucía Isidoro García ha realizado bajo su dirección el trabajo **"Potencial efecto hipotensor de esteroides sexuales masculinos"** como Tesis para alcanzar el Grado de Doctor.

*"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"*

Ciudad Universitaria a 22 de Enero de 2018, Ciudad de México.

Firma manuscrita en tinta negra.

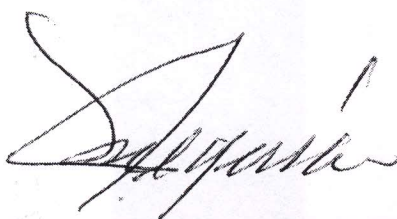
Fdo.: Dra. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA





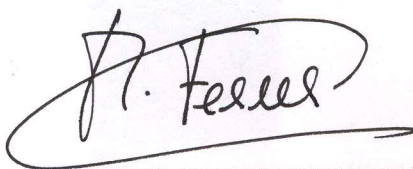
El comité tutor de la alumna LUCÍA ISIDORO GARCÍA ha aprobado  
la Tesis de Doctorado:

## **Potencial efecto hipotensor de esteroides sexuales masculinos**



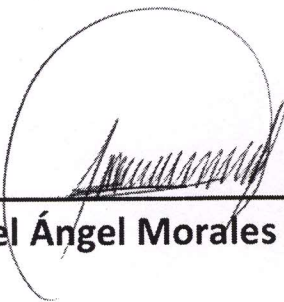
---

**Dra. María Mercedes Perusquía Nava**



---

**Dra. Mercedes Ferrer Parra**



---

**Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza**



El presente estudio ha sido financiado con proyectos subvencionados por:

- Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) *Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-UNAM (PAPIIT, IN203815)*, concedido a Mercedes Perusquía.
- Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI1100406), Comunidad de Madrid (S2013/ABI-2783, “INSPIRA1-CM”) y Fondo Europeo de Desarrollo Regional a Mercedes Ferrer.

Lucía Isidoro ha sido becada por el CONACYT (616802/330085) y Cátedra Isaac Costero del Grupo UAM-Santander.



**Parte de esta Tesis fue publicada como:**

Lucía Isidoro, Mercedes Ferrer & Mercedes Perusquía (2018): Vasoactive androgens: Vasorelaxing effects and their potential regulation of blood pressure, Endocrine Research, DOI: 10.1080/07435800.2018.1448868

To link to this article:

<https://doi.org/10.1080/07435800.2018.1448868> (ver anexo).



## ***AGRADECIMIENTOS***





***“Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía. Para terminar un gran proyecto, hace falta perseverancia.”***

Anónimo

Es momento de escribir los agradecimientos de mi tesis doctoral, y eso implica que un proyecto que inicié hace años ha llegado a su fin. Recuerdo el día, el lugar, en el que comenzó esta aventura y que ha conformado un gran capítulo de mi vida. Fue en Septiembre de 2013 cuando vi un cartel para la realización de un Doctorado Doble entre la UAM (Madrid, España) y la UNAM (Ciudad de México, México) sobre la hipertensión arterial y las hormonas esteroides sexuales masculinas. No lo dudé e inicié los trámites necesarios para poder formar parte de ese trabajo de investigación. No puedo decir que haya sido un camino fácil ni cómodo sino que ha sido una lucha constante contra las adversidades, pero no me arrepiento de la decisión que tomé. He obtenido un gran premio académico y una gran satisfacción por haber cumplido un sueño.

Quisiera agradecer a mis directoras, la Dra. Perusquía y la Dra. Ferrer por comprometerse a dirigir esta tesis, cediendo sus instalaciones, su tiempo y por supuesto toda su experiencia para obtener el mejor de los resultados, el cual así ha sido.

A mis compañeros de laboratorio en la UNAM: QFB. Óscar David García Hernández, Biól. Rafael Evaristo Hernández Contreras y en especial, Juana Trejo González quienes me acogieron como uno más en su familia. Gracias a su ayuda en el trabajo, su alegría y sus risas han marcado con un énfasis especial esa etapa, creando recuerdos inolvidables y amistades para siempre.

También a M.C. Diva María Villalpando Grajeda, M.C. Mireya Ruíz Losada y a M.C. Maite Alameda Felgueiras, mis compañeras de laboratorio en la UAM, quienes me han ayudado siempre, considerándolas más que amigas, hermanas de Doctorado, un título único y perdurable en el tiempo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y al Departamento de Biología Celular y Fisiología. Gracias a Azucena Ayala Pichardo, Secretaría de Enseñanza; Lic. Ivonne Torres Cortés Secretaria Técnica del Doctorado de la UNAM; y Lizeth González Cruz, Jefa de Área del Módulo de Becas, por ayudar en las tareas administrativas. Gracias a Lic. Omar Rangel Rivera, Jefe de la Sección de Cómputo y en extensión, al Departamento de Cómputo del Instituto de Investigaciones Biológicas de la UNAM por su ayuda y dedicación en la realización de las videoconferencias semestrales con España. Gracias a M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo responsable de la Unidad del Bioterio por su apoyo en la producción y crianza de las ratas SHR y WKY.

A la Facultad de Medicina de la UAM y al Departamento de Fisiología. Gracias a Ana M<sup>a</sup> Sánchez Abad, Secretaria Departamento de Bioquímica y a Concepción Domínguez Moreno, Secretaria de Departamento de Fisiología, por ayudar en las tareas administrativas. Gracias a Juan Carlos Palomino Arroyo, responsable de la Unidad de Audiovisuales, por su tiempo y dedicación para la realización de las videoconferencias semestrales con México. Gracias a David Muñoz Valverde, Director del Animalario, por el cuidado y mantenimiento de los animales.

Gracias a todos ellos, por su ayuda tanto en persona como en la distancia.

Quisiera hacer una mención con un cariño y agradecimiento especial a los animales de experimentación, sin ellos, muchos descubrimientos y avances en el campo de la investigación no habrían sido posibles.

Y por último, gracias a mis padres, Pilar y Domingo, mil veces gracias. Gracias por vuestra confianza, vuestra ayuda, vuestra cercanía, siempre habéis estado a mi lado sin poner frenos a mis sueños. Este éxito alcanzado también es vuestro, es NUESTRO.

## ***RESUMEN***



Se ha establecido que la testosterona (TES) y sus dihidroderivados noaromatizables, 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -dihidrotestosterona (5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -DHT), son andrógenos vasoactivos por inducir vasorelajación en diferentes lechos vasculares *in vitro* y, consecuentemente producen un efecto vasodepresor sobre la respuesta presora de noradrenalina e hipotensor en ratas macho normotensas *in vivo*. Hipotetizando que este grupo de andrógenos puedan también provocar disminución de la hipertensión arterial (HA) en ratas conscientes, el objetivo de esta Tesis fue: 1) estudiar el efecto de TES, 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -DHT sobre la presión arterial (PA) de ratas macho conscientes espontáneamente hipertensas (SHR) vs. sus controles normotensos ratas Wistar Kyoto (WKY); 2) comprobar si la hipotestosteronemia está implicada en la patogénesis de la HA; 3) esclarecer el mecanismo de la potencial acción antihipertensiva de cada andrógeno, explorando: a) el efecto vasorelajante de los andrógenos en un lecho vascular aislado de conductancia como la aorta torácica vs. un lecho de resistencia como la arteria mesentérica, precontraídos con dos agentes contráctiles de diferente naturaleza (KCl o fenilefrina, Phe); y b) el efecto de los andrógenos en la liberación y función vasomotora de los neurotransmisores óxido nítrico (NO), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y noradrenalina (NA). Los resultados mostraron que TES, 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -DHT produjeron una pérdida de la PA en ratas WKY y una respuesta antihipertensiva en SHR, siendo 5 $\beta$ -DHT el andrógeno más potente y eficaz. La orquidectomía provocó el desarrollo de HA. Los tres andrógenos indujeron una respuesta vasodilatadora dependiente de la concentración tanto en la aorta torácica como en la arteria mesentérica. La mayor sensibilidad de la contracción inducida por KCl al efecto relajante de los andrógenos indica que existe una mayor participación del bloqueo de la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje. Aún así, el efecto vasodilatador de 5 $\beta$ -DHT en la arteria mesentérica en respuesta a la vasoconstricción simpática, es especialmente relevante cuando existe HA. Este resultado, junto al incremento en la respuesta vasodilatadora inducida por NO y CGRP provocado por 5 $\beta$ -DHT podría explicar su marcada potencia y eficacia antihipertensiva. En conjunto, estos resultados indican que la deficiencia androgénica contribuye a la patogénesis de la HA y que el andrógeno 5 $\beta$ -DHT constituiría un excelente candidato para el tratamiento de esta patología.



# ***ABSTRACT***





It has been established that testosterone (TES) and its nonaromatizable dihydroderivatives, 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -dihydrotestosterone (5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -DHT), are vasoactive androgens by inducing vasorelaxation in different vascular beds *in vitro* and, consequently, they produce a vasodepressor effect on the noradrenaline pressor response and an *in vivo* hypotensive effect on male normotensive rats. Hypothesizing that this group of androgens can also cause a decrease in arterial hypertension (AH) in conscious rats, the objective of this Thesis was: 1) to study the effect of TES, 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -DHT on blood pressure (BP) of conscious male spontaneously hypertensive rats (SHR) vs. its normotensive control Wistar Kyoto rats (WKY); 2) to evaluate if hypotestosteronemia is involved in the pathogenesis of AH; 3) to clarify the mechanism of the potential antihypertensive action of each androgen, by exploring: a) the vasorelaxant effect of androgens in an isolated vascular bed of conductance such as the thoracic aorta vs. a bed of resistance such as the mesenteric artery, precontracted with two contractile agents of different nature (KCl or phenylephrine, Phe); and b) the effect of androgens on the release and vasomotor function of the neurotransmitters nitric oxide (NO), calcitonin gene-related peptide (CGRP) and noradrenaline (NA). The results showed that TES, 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -DHT produced a loss of BP in WKY rats and an antihypertensive response in SHR, being 5 $\beta$ -DHT the most potent and effective androgen. Orchidectomy caused the development of AH. All three androgens induced a concentration-dependent vasodilator response in both thoracic aorta and mesenteric artery. The greater sensitivity of KCl-induced contraction to the relaxant effect of androgens indicates that there is a greater involvement of blocking calcium entry through voltage-dependent calcium channels. Even so, the vasodilatory effect of 5 $\beta$ -DHT in mesenteric artery in response to sympathetic vasoconstriction is especially relevant when AH exists. This result, together with the increase in the vasodilatory response induced by NO and CGRP caused by 5 $\beta$ -DHT could explain its marked potency and antihypertensive efficacy. Taken together, these results indicate that androgen deficiency contributes to the pathogenesis of AH and that the androgen 5 $\beta$ -DHT could constitute an excellent candidate for the treatment of this pathology.



# ***ÍNDICE GENERAL***



	Páginas
<b>RESUMEN</b>	3
<b>ABSTRACT</b>	7
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	17
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	21
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	25
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	31
1. Generalidades de las hormonas esteroides	31
1.1. Andrógenos. Síntesis y Función	34
2. Mecanismos de acción de las hormonas esteroides sexuales	36
3. Efecto de los andrógenos sobre el sistema cardiovascular	40
3.1 Efecto de los andrógenos sobre el tono vasomotor	41
3.2 Efecto de los andrógenos sobre la presión arterial	43
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	49
<b>III. HIPÓTESIS</b>	53
<b>IV. OBJETIVOS</b>	57
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	61
1. Animales	61
2. Procedimientos quirúrgicos	61
2.1. Implantación de los catéteres	61
2.2 Castración de ratas normotensas	62
3. Registro de los parámetros hemodinámicos	63
3.1. Evaluación del efecto antihipertensivo de los andrógenos	63
3.2. Efecto de la orquidectomía sobre la presión arterial de ratas normotensas (WKY y Wistar)	66
4. Aislamiento y preparación del tejido vascular	67
4.1. Registro de la tensión isométrica	68
4.1.1. Efecto vasodilatador de los andrógenos	70
4.1.2. Efecto de los andrógenos sobre la respuesta vasomotora de NO, CGRP y NA	72

4.1.3. Efecto de los andrógenos sobre la respuesta inducida por estimulación eléctrica	73
4.2. Liberación de neurotransmisores	75
5. Compuestos químicos utilizados	77
6. Presentación de los datos y análisis estadístico	77
<b>VI. RESULTADOS</b>	83
1. Experimentos <i>in vivo</i> en animales conscientes	83
1.1. Efecto antihipertensivo de los andrógenos en ratas espontáneamente hipertensas	83
1.2. Efecto hipotensor de los andrógenos en ratas normotensas Wistar-Kyoto	85
1.3. Efecto de 5 $\beta$ -DHT sobre el aumento de la presión arterial por activación de los CCDV-L inducida por Bay K8644	87
1.4. Efecto de la orquidectomía sobre la presión arterial	89
2. Experimentos funcionales en tejido aislado	91
2.1. Vasorelajación inducida por andrógenos en aorta torácica y arteria mesentérica precontraída con KCl o Phe	91
2.2. Comparación de la potencia vasorelajante de cada andrógeno	94
2.3. Comparación de la eficacia vasorelajante de cada andrógeno	95
2.4. Efecto de los andrógenos sobre la función de las inervaciones nitrérgica, sensitiva y adrenérgica en arteria mesentérica aislada:	98
2.4.1. Liberación de los neurotransmisores NO, CGRP y NA	98
2.4.2. Respuesta vasomotora de los neurotransmisores NO, CGRP y NA	101
2.4.3. Respuesta inducida a EE	105
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	109
1. Efecto antihipertensivo de los andrógenos	109
2. Efecto vasodilatador de los andrógenos	115
3. Efecto de los andrógenos sobre la función de la inervación nitrérgica, sensitiva y adrenérgica en arteria mesentérica	118
4. Relación Estructura química – efectos fisiológicos de los andrógenos	127
5. Implicaciones clínicas	129

<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	133
---------------------------	-----

<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	137
---------------------------------------	-----

<b>X. ANEXO</b>	159
-----------------	-----

*Artículo publicado en Endocrine Research*





## ***ÍNDICE DE FIGURAS***



	<b>Páginas</b>
<b>FIGURA 1.</b> Estructura común de las hormonas esteroideas	31
<b>FIGURA 2.</b> Ruta biosintética de la testosterona y sus dihidro-derivados	35
<b>FIGURA 3.</b> Características de la acción de las hormonas esteroideas sexuales en una célula muscular lisa	37
<b>FIGURA 4.</b> Mecanismos de acción genómicos y no genómicos de los andrógenos en la célula del músculo liso vascular	39
<b>FIGURA 5.</b> Cateterismo arterial y venoso de las ratas para el registro de los parámetros hemodinámicos	62
<b>FIGURA 6.</b> Sistema invasivo para registro de parámetros hemodinámicos en el animal consciente	64
<b>FIGURA 7.</b> Sistema no invasivo para registro de la presión arterial mediante pletismografía caudal	67
<b>FIGURA 8.</b> Sistema de registro de tensión isométrica para aorta torácica y arteria mesentérica aisladas	69
<b>FIGURA 9.</b> Disposición en el baño de órganos de un anillo de arteria mesentérica entre dos electrodos de platino conectados a un estimulador eléctrico	74
<b>FIGURA 10.</b> Cámara utilizada para la liberación de neurotransmisores inducida por estimulación eléctrica en arteria mesentérica	75
<b>FIGURA 11.</b> Efecto de los andrógenos sobre la presión arterial en ratas conscientes espontáneamente hipertensas y en ratas normotensas	84
<b>FIGURA 12.</b> Efecto de los andrógenos sobre la frecuencia cardíaca en ratas conscientes espontáneamente hipertensas y en ratas normotensas	86
<b>FIGURA 13.</b> Respuesta presora y vasodepresora inducida por Bay K8644 y 5 $\beta$ -DHT, respectivamente, en rata consciente espontáneamente hipertensa	88
<b>FIGURA 14.</b> Presión arterial media en ratas normotensas orquidectomizadas	90

---

<b>FIGURA 15.</b> Efecto vasorelajante inducido por andrógenos en vasos sanguíneos aislados de ratas espontáneamente hipertensas	92
<b>FIGURA 16.</b> Efecto vasorelajante inducido por andrógenos en vasos sanguíneos aislados de ratas normotensas	93
<b>FIGURA 17.</b> Efecto relajante máximo de los andrógenos en vasos sanguíneos aislados de ratas espontáneamente hipertensas y ratas normotensas	96
<b>FIGURA 18.</b> Conformación tridimensional de la testosterona y sus dihidroderivados	97
<b>FIGURA 19.</b> Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT en la liberación de NO inducida por estimulación eléctrica en segmentos de arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas y ratas normotensas	99
<b>FIGURA 20.</b> Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT en la liberación de CGRP inducida por estimulación eléctrica en segmentos de arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas y ratas normotensas	100
<b>FIGURA 21.</b> Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT en la liberación de NA inducida por estimulación eléctrica en segmentos de arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas y ratas normotensas	101
<b>FIGURA 22.</b> Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT sobre las curvas concentración-respuesta a nitroprusiato de sodio en segmentos de arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas y ratas normotensas	102
<b>FIGURA 23.</b> Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT sobre las curvas concentración-respuesta a CGRP en segmentos de arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas y ratas normotensas	103
<b>FIGURA 24.</b> Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT sobre las curvas concentración-respuesta a NA en segmentos de arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas y ratas normotensas	104
<b>FIGURA 25.</b> Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT sobre la respuesta contráctil inducida por estimulación eléctrica en segmentos de arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas y ratas normotensas	105

## ***ÍNDICE DE TABLAS***



	<b>Páginas</b>
<b>TABLA 1.</b> Disminución de la presión arterial dependiente de la administración de andrógenos, en ratas conscientes espontáneamente hipertensas y ratas normotensas	87
<b>TABLA 2.</b> Valores de potencia y eficacia relativa de la vasorelajación inducida por andrógenos sobre la contracción inducida por KCl o Phe en aorta torácica y arteria mesentérica aislada de ratas espontáneamente hipertensas y ratas normotensas	94





## ***LISTA DE ABREVIATURAS***



<b>DAF2</b>	4,5-diaminofluoresceína
<b>DAF-2 DA</b>	4,5-diaminofluorescencia diacetato
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>AMPc</b>	Adenosínmonofosfato cíclico
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b>ANOVA</b>	Análisis Normal de Varianza
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>Ang 1-7</b>	Angiotensina 1-7
<b>AR</b>	Androgen Receptor (Receptor de Andrógenos)
<b>AT</b>	Aorta torácica
<b>~</b>	Aproximadamente
<b>AM</b>	Arteria mesentérica
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b>NAHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de Sodio
<b>K<sub>v</sub></b>	Canales de potasio operados por voltaje
<b>K<sub>ATP</sub></b>	Canales de potasio sensibles ATP
<b>BK<sub>Ca</sub></b>	Canales de potasio sensibles a Calcio
<b>CCDV</b>	Canales de calcio dependientes de voltaje
<b>CCDV-L</b>	Canales de calcio dependientes de voltaje tipo L
<b>CMLV</b>	Células del músculo liso vascular
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Calcio
<b>KCl</b>	Cloruro de Potasio
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>CICUAL</b>	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración Inhibitoria Media o Concentración Inhibitoria 50
<b>DHEA</b>	Dehidroepiandrosterona
<b><math>\Delta</math></b>	Delta
<b>DHT</b>	Dihidrotestosterona
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dosis Efectiva Media o Dosis Efectiva 50
<b>E<sub>max</sub></b>	Efecto máximo
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>EEM</b>	Error Estándar de la Media
<b>EE</b>	Estimulación eléctrica
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ETOH</b>	Etanol absoluto
<b>et al</b>	<i>et aliud, et alii</i> ( y colaboradores)
<b>EGFR</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>Phe</b>	Fenilefrina
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Potasio monobásico
<b>FC</b>	Frecuencia cardíaca
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>g</b>	Gramo
<b>GMPc</b>	Guanosínmonofosfato cíclico

---

<b>Hz</b>	Herzios
<b>HA</b>	Hipertensión Arterial
<b>h</b>	Hora
<b>FSH</b>	Hormona foliculoestimulante
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de la gonadotropina
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>i.e.</b>	<i>Id est</i> (esto es)
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol- 1,4,5-trifosfato
<b>i.m.</b>	Intramuscular
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.v.</b>	Intravenosa
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>L</b>	Litro
<b>log</b>	Logaritmo
<b>±</b>	Más menos
<b>≥</b>	Mayor o igual que
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasas de matriz extracelular
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μmol</b>	Micromol
<b>μM</b>	Micromolar
<b>mA</b>	Miliamperios
<b>mg</b>	Miligramo
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mmHg</b>	Milímetros de Mercurio
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mN</b>	Milínewton
<b>ms</b>	Milisegundos
<b>mV</b>	Milivoltio
<b>min</b>	Minuto
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>L-NAME</b>	N-Nitroarginina metil éster
<b>NIH</b>	National Institute of Health (Instituto Nacional de Salud)
<b>NPS</b>	Nitroprusiato de Sodio
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>n</b>	Número
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORQ</b>	Orquidectomía
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>CGRP</b>	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
<b>pM</b>	Picomolar

<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>%</b>	Porcentaje
<b>PA</b>	Presión Arterial
<b>PAD</b>	Presión Arterial Diastólica
<b>PAM</b>	Presión Arterial Media
<b>PAS</b>	Presión Arterial Sistólica
<b>p</b>	Probabilidad
<b>PKC</b>	Proteínquinasa C
<b>TRPV1</b>	Receptor de potencial transitorio vallinoide 1
<b>®</b>	Registrado
<b>s</b>	Segundos
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SRA</b>	Sistema renina-angiotensina
<b>SHR</b>	Spontaneously Hypertension Rats (Ratas Espontáneamente Hipertensas)
<b>SD</b>	Sprague Dawley
<b>s.c.</b>	Subcutáneo
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de Magnesio
<b>Tfm</b>	Testículo feminizante
<b>TES</b>	Testosterona
<b>ADT</b>	Androgen deprivation therapy (Terapia de deprivación androgénica)
<b>DAF-2T</b>	Triazolfluoresceína
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>v/v</b>	Volumen / Volumen
<b>WKY</b>	Wistar Kyoto



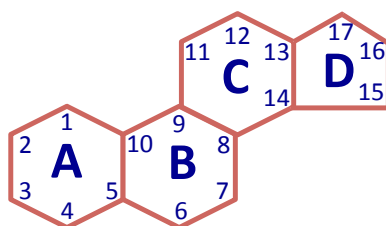
## ***I. INTRODUCCIÓN***





### 1. Generalidades de las hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas derivan del colesterol, y son una familia de hormonas que poseen una estructura básica común: el anillo de esterano o ciclopentanoperhidrofenantreno (que está compuesto de tres anillos de seis carbonos y un anillo de cinco carbonos) (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura común de las hormonas esteroideas (sistema de anillos del ciclopentanoperhidrofenantreno). Consiste en 4 anillos fusionados (A, B, C, D), con un total de 17 átomos de carbono.

Los esteroideos no se almacenan en cantidades apreciables sino que una vez que son secretados, pasan a la circulación general y se distribuyen por todos los tejidos corporales, siendo posteriormente metabolizados principalmente en el hígado. Las hormonas esteroideas son compuestos hidrofóbicos debido a su carácter no polar lo que facilita su difusión a través de la membrana celular de las células blanco. En la sangre estas hormonas son transportadas unidas a proteínas plasmáticas hasta llegar a los tejidos blanco. La vida media de los esteroideos oscila entre los 30 y 90 minutos.

El presente trabajo se centra en las hormonas esteroideas sexuales, las cuales se dividen en tres familias dependiendo del número de átomos de

---

carbono: progestinas (21), estrógenos (18) y andrógenos (19). Teniendo además en cuenta sus funciones biológicas más relevantes:

1. **Progestinas:** preparan el útero para la implantación del huevo cigoto y el mantenimiento de la gestación, disminuyen la frecuencia e intensidad de las contracciones uterinas y estimulan la secreción de la leche (Clark *et al.*, 2011). Ejercen un efecto hipnótico y depresor sobre el Sistema Nervioso Central (SNC). Poseen acción termorreguladora. Interviene en la regulación de la secreción de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH) hipotalámica y de la hormona foliculoestimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) en la hipófisis. Disminuyen la reabsorción de sodio al competir con la aldosterona (Taraborrelli, 2015).
2. **Estrógenos:** promueven el desarrollo de las características sexuales secundarias femeninas (estimulan el crecimiento del aparato genital femenino y de la glándula mamaria, en especial el desarrollo de los conductos galactóforos, ejercen control del ciclo ovárico en los mamíferos). Determinan la distribución de la grasa del cuerpo. Inhiben el crecimiento óseo lineal y aceleran el cierre epifisario, evitan la desmineralización del hueso, por lo que protegen de la osteoporosis. Participan en la fisiología del sistema vascular ejerciendo funciones cardioprotectoras (White, 2002). Ejercen efectos generales sobre el SNC (Toran-Allerand, 2005). Ejercen acción estimulante o supresora del hipotálamo sobre la liberación de hormonas gonadotrópicas. Estimulan la formación de aldosterona y angiotensinógeno. Aumentan la reabsorción de sodio en el túbulo renal, por lo que favorecen la retención de líquidos (Nelson y Bulun, 2001).
3. **Andrógenos:** promueven el desarrollo de las características masculinas secundarias (aumento del tamaño del escroto, pene y de las glándulas secretoras accesorias, engrosamiento de la voz, producción de vello genital y facial, estimulan la espermatogénesis y conducta sexual) (Krone *et al.*, 2007; Auchus y Miller, 2012). Estimulan la síntesis proteica y por su efecto andrógeno potencian el desarrollo de la musculatura esquelética (Kelly y Jones, 2015), retardando el cierre del cartílago epifisario, estimulando el crecimiento óseo y la retención de calcio. Participan en el metabolismo lipídico (O'Reilly *et al.*, 2014) e intervienen en la regulación del

equilibrio hídrico y electrolítico. También ejercen efectos en el SNC sobre el crecimiento, maduración, diferenciación y funcionamiento de las células cerebrales, habiéndose identificado receptores específicos en diferentes estructuras (Filová *et al.*, 2013). Además, por retroalimentación negativa la testosterona (TES) inhibe la secreción de las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH) al inhibir en el hipotálamo la producción de GnRH hacia el sistema portal hipotálamohipofisario (Bagatell *et al.*, 1994).

Además de las anteriores funciones, los andrógenos son responsables de otro tipo de funciones adicionales, menos conocidas pero con igual importancia, como las ejercidas sobre:

- i) distintas células hematopoyéticas: se ha descrito que los andrógenos estimulan la eritropoyesis a través de un incremento en la producción renal de eritropoyetina (Malgor *et al.*, 1975).
- ii) el sistema inmune: a nivel de su programación y modulación influyen en el desarrollo de la inmunidad celular en tejidos linfoides primarios (médula ósea y timo); adicionalmente, los andrógenos ejercen efectos inmunomoduladores en células T y B periféricas, también sobre el tamaño y la composición del timo, al disminuir la proliferación y aumentar la apoptosis celular (Olsen *et al.*, 2001). Globalmente, los andrógenos ejercen un efecto protector frente al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Ahmed *et al.*, 1993).
- iii) el metabolismo lipídico: ha sido descrito que los andrógenos incrementan la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y disminuyen la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (O'Reilly *et al.*, 2014).
- iv) el sistema cardiovascular: la respuesta vasodilatadora de los andrógenos ha sido mostrada en diferentes lechos vasculares y especies (revisado por: Yildiz y Seyrek, 2007; Perusquía y Stallone, 2010; Kelly y Jones, 2013). Estos y otros efectos sobre el sistema cardiovascular serán tratados en profundidad en el apartado correspondiente.

En particular, las hormonas esteroides sexuales masculinas (andrógenos) son sujeto de estudio en la presente Tesis.

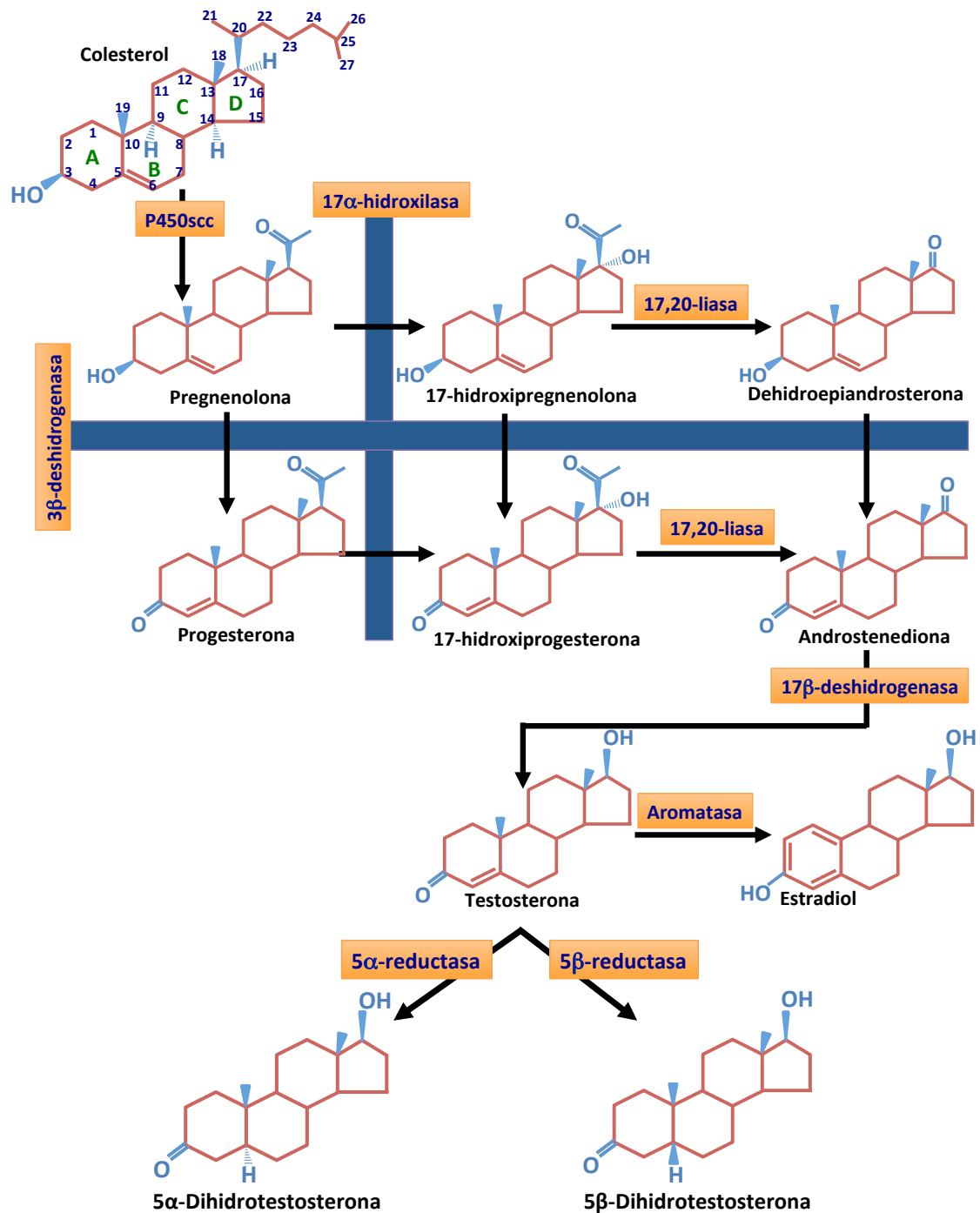
---

### 1.1. Andrógenos, Síntesis y Función

La biosíntesis de los andrógenos (Figura 2) se inicia por la bioconversión del colesterol a pregnenolona, que ocurre en la mitocondria de las células esteroidogénicas, por hidroxilación en el carbono 20 y 22. La pregnenolona sale de la mitocondria y en el retículo endoplásmico puede tomar dos rutas, ser bioconvertida a progesterona o a 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona. Tanto la pregnenolona como la progesterona son sustratos de la 17 $\alpha$ -hidroxilasa (Hu *et al.*, 2010). Cuando el sustrato es la pregnenolona, el primer producto al que se transforma es la 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, la que posteriormente es transformada a dehidroepiandrosterona (DHEA). La DHEA requiere una biotransformación por acción de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa para convertirse en androstenediona. Si el sustrato es la progesterona, el producto es la 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona que es bioconvertida a androstenediona y, esta a su vez se biotransforma a TES por acción de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Mindnich *et al.*, 2004).

La TES presenta dos rutas de biotransformación:

1. Por acción de la aromatasa, el anillo A de la estructura es aromatizado a estrona para convertirse a estradiol (Figura 2).
2. Por acción de las enzimas 5 $\alpha$ -reductasa o 5 $\beta$ -reductasa la TES puede ser biotransformada hacia sus dihidroderivados inmediatos, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona y 5 $\beta$ -dihidrotestorona (5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -DHT), respectivamente, resultantes de la hidrogenación del doble enlace en la posición C4. Ambos dihidrometabolitos no pueden ser aromatizados hacia a estrógenos, como ocurre con la TES (Penning *et al.*, 2000), ver Figura 2. Sin embargo, los dihidrometabolitos son biotransformados a tetrahidroderivados por acción de la 3 $\alpha$ - o 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, obteniéndose a partir del andrógeno 5 $\alpha$ -DHT, androstanediol y epiandrostanediol; y a partir de 5 $\beta$ -DHT, la etiocolanolona y epitocolanolona (no mostrado en la Figura 2).



**Figura 2.** Ruta biosintética de la testosterona y de sus dihidroderivados. Los primeros pasos en la esteroidogénesis de los andrógenos conllevan a la producción de testosterona y son comunes en la corteza adrenal, células de Leydig de los testículos y células teca-les de los ovarios. Los siguientes pasos ocurren en tejidos periféricos como la piel, la próstata y epidídimo.

---

Los andrógenos, se sintetizan principalmente en las células de Leydig de los testículos y en menor proporción en el hipotálamo, placenta, hígado, riñón, tejido adiposo subcutáneo, músculo esquelético, en la zona reticular de la corteza suprarrenal de las glándulas suprarrenales y en los ovarios (Miller y Auchus, 2011). Como se mencionó, las hormonas esteroides sexuales masculinas circulan en sangre asociadas a proteínas plasmáticas (a globulina transportadora de hormonas sexuales o a albúmina) y sólo un 2% circula de forma libre.

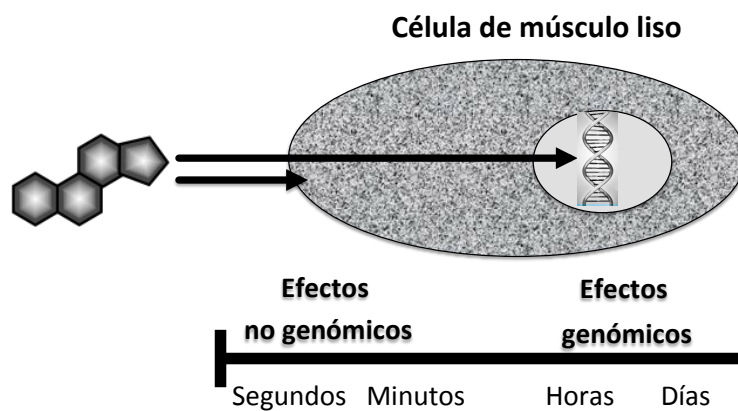
## **2. Mecanismos de acción de las hormonas esteroides sexuales**

Las hormonas esteroides sexuales llevan a cabo sus funciones mediante dos mecanismos:

-Mecanismos de acción genómica: donde las hormonas esteroides sexuales atraviesan la membrana celular por difusión simple y se distribuyen en el citoplasma y núcleo de las células blanco, donde se unen con alta especificidad y selectividad a sus receptores intracelulares específicos. Esta unión (receptor-esteroide) produce un cambio alostérico en la conformación del receptor y permite su activación. A continuación, los receptores activados se dimerizan y se unen selectivamente a secuencias palindrómicas en el ADN que conllevan a la regulación en la expresión de diversos genes produciendo una respuesta biológica que es irreversible. Este mecanismo de acción se caracteriza por ser un mecanismo de larga latencia y duración, cuyos efectos se observan después de horas, días e incluso meses (Roy *et al.*, 1999; Perusquía, 2001; Heinlein y Chang, 2002).

-Mecanismos de acción no genómica: se caracteriza porque los efectos de la hormona esteroide son muy rápidos (ocurre en segundos o minutos) y reversibles (después que se retira la hormona esteroide sexual del tejido o de la célula, el efecto desaparece), las respuestas pueden producirse en presencia de inhibidores del receptor de andrógenos como la flutamida (Yue *et al.*, 1995, Perusquía *et al.*, 2012), de la síntesis proteica como la cicloheximida (Gutiérrez *et al.*, 1994) o de la transcripción como la actinomicina D (Perusquía *et al.*, 2007). También los efectos rápidos pueden observarse usando

hormonas esteroideas que estén acopladas a proteínas, como el suero de albumina de bovino (TES-BSA), dicho binomio impide que el esteroide penetre la membrana plasmática y aún así, la respuesta biológica es dada (English *et al.*, 2000; Kelly y Jones, 2013). Además, existe una evidencia convincente de un efecto no genómico cuando se presenta en ratas machos con testículo feminizante (Tfm) (Perusquía *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Características de la acción de las hormonas esteroideas sexuales en una célula blanco como es la célula muscular lisa. **Los efectos no genómicos:** son de inicio rápido (segundos, minutos), de corta latencia y duración (segundos-minutos) y una vez que el esteroide se retira del tejido mediante lavados el efecto desaparece, la acción no se modifica por inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas. **Los efectos genómicos:** son lentos (semanas, años) y de mayor duración (horas, días, años), estos efectos no se pueden retirar con lavados debido a que el esteroide ya se internalizó en la célula. Esquema modificado de Perusquía, 2001.

El mecanismo de acción no genómico se inicia en la membrana y puede implicar la interacción de las hormonas esteroideas sexuales con:

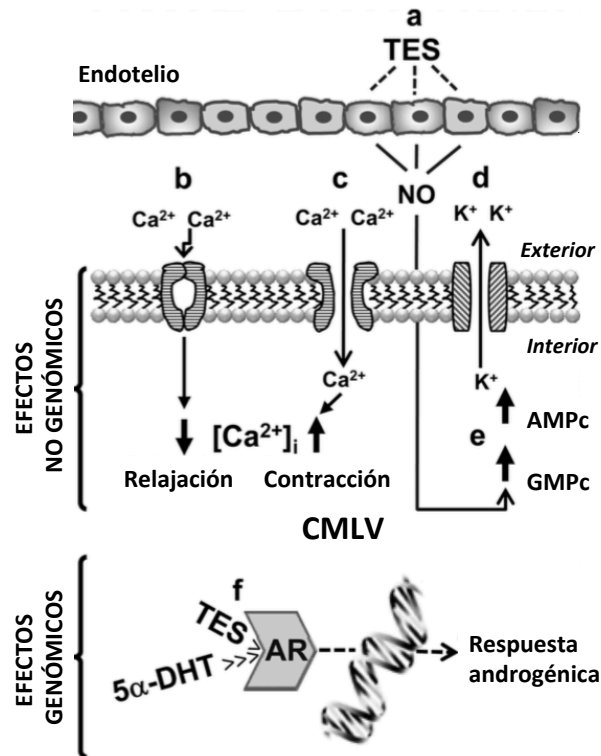
1) sitios de unión en la membrana de células como linfocitos T, macrófagos, espermocitos u osteoblastos entre otras (Lieberherr y Grosse, 1994; Benten *et al.*, 1999; Walker, 2003) que llevan a la producción de segundos mensajeros;

---

2) receptores de membrana que pueden estar acoplados a proteínas G (Pi *et al.*, 2010), dando lugar así a la activación de la fosfolipasa C y la adenilato ciclasa (AC), lo que incrementa los niveles intracelulares de los segundos mensajeros inositol- 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y adenosínmonofosfato cíclico (AMPc) respectivamente; y

3) canales iónicos, lo que permite regular la conductancia de los iones calcio e influir directamente sobre su concentración intracelular a través del bloqueo de la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular por los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (CCDV-L) (Scragg *et al.*, 2004; 2007; Montaña *et al.*, 2008). También puede actuar en la regulación de la conductancia de los iones potasio por la apertura de los canales de K<sup>+</sup>, en particular los dependientes de calcio de alta conductancia (BK<sub>Ca</sub>) (Ding y Stallone, 2001; Deenadayalu *et al.*, 2001; Tep-areenan *et al.*, 2002). Ver Figura 4.





**Figura 4.** Mecanismos de acción genómicos y no genómicos de los andrógenos en la célula del músculo liso vascular (CMLV): **a:** Mecanismos endotelio-dependientes, acción directa de la hormona esteroide sexual sobre las células endoteliales lo que involucra la liberación de factores relajantes derivados del endotelio, particularmente el óxido nítrico (NO), el cual difunde a las células musculares lisas adyacentes donde se incrementa el guanosínmonofosfato cíclico (GMPc), y de esta manera se produciría una vasodilatación. **b:** TES (a concentraciones fisiológicas) y 5 $\beta$ -DHT (a concentraciones de nM a  $\mu$ M) comparten el mismo sitio de unión molecular que las dihidropiridinas en los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) para provocar un bloqueo del canal de calcio lo que restringe la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en la CMLV para inducir vasodilatación (relajación). **c:** TES a concentraciones farmacológicas (superiores a  $1 \mu\text{M}$ ) activa CCDV lo que incrementa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y aumenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induciendo vasoconstricción (contracción) (Montaño et al., 2008). **d:** TES a concentraciones suprafisiológicas ( $> 100 \text{ nM}$ ) activa los canales de potasio operados por voltaje o los canales de potasio de alta conductancia sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que aumenta el flujo de salida de  $\text{K}^+$  e induce la hiperpolarización de CMLV y su vasorrelajación (Deenadayalu et al., 2001). **e:** TES pero no 5 $\beta$ -DHT a concentraciones farmacológicas ( $> 30 \mu\text{M}$ ) es capaz de incrementar la producción de GMPc y adenosínmonofosfato cíclico (AMPc). **f:** las acciones genómicas de TES y 5 $\alpha$ -DHT están mediadas por el receptor de andrógenos citosólico (AR). 5 $\alpha$ -DHT tiene la mayor afinidad por el AR y media muchos efectos androgénicos, mientras que 5 $\beta$ -DHT tiene poca afinidad y no tiene efectos biológicos (Fang et al., 2003). Esquema modificado de Perusquía y Stallone, 2010.

---

### **3. Efecto de los andrógenos sobre el sistema cardiovascular**

La relación entre esteroides sexuales y enfermedades cardiovasculares (ECV) se ha estudiado arduamente en los últimos años, aceptándose que las hormonas esteroides femeninas, especialmente los estrógenos, ejercen un efecto protector sobre el sistema cardiovascular, siendo de particular importancia el efecto vasodilatador que producen (revisado por: Farhat *et al.*, 1996; Mendelsohn y Karas, 1999). En contraste, los andrógenos, esteroides masculinos, han recibido poca atención a este respecto, cuestionando si ejercen una acción benéfica o perjudicial sobre el sistema cardiovascular.

Sin embargo, en los últimos años, diversos estudios poblacionales realizados en varones han detectado una mayor frecuencia de padecer ECV en aquellos que presentaban una disminución en los niveles plasmáticos de TES (revisado por: Khaw y Barret-Connor, 1988; Phillips *et al.*, 1994; Barret-Connor, 1995; Morris y Channer, 2012; revisado por Ruige *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que hombres que padecían patologías cardiovasculares, como la aterosclerosis, hipertensión arterial (HA) y disfunción endotelial, mejoraron durante el tratamiento con una terapia sustitutiva de TES (Malkin *et al.*, 2006b; Jones, 2010; revisado por Morgentaler *et al.*, 2015; revisado por Sharma *et al.*, 2015; revisado por Pongkan *et al.*, 2016). Igualmente, en varones sometidos al bloqueo farmacológico de la biosíntesis de andrógenos en el tratamiento de carcinoma de próstata, se han observado importantes alteraciones en la función cardiovascular (Chou *et al.*, 2015). Además, en hombres y mujeres que padecen HA, sus niveles plasmáticos de andrógenos son más bajos que en pacientes normotensos (Barrett-Connor y Khaw, 1988; Khaw y Barrett-Connor, 1988; Hughes *et al.*, 1989; Phillips *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1997; English *et al.*, 1997; Svartberg *et al.*, 2004). Por ello, se ha propuesto que en adultos mayores el cese en la producción de esteroides gonadales conlleva al desarrollo de ECV. Lo que sugiere que la hipotestosteronemia pudiera ser un factor de riesgo para el desarrollo de la HA.

Tomado en conjunto estos hallazgos se ha aceptado también un efecto protector de la TES sobre el sistema cardiovascular.

### **3.1. Efecto de los andrógenos sobre el tono vasomotor**

En apoyo a lo anterior, existen también numerosos estudios experimentales que muestran contundentemente que la TES produce vasorrelajación tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes lechos vasculares de varias especies de animales incluyendo al humano (Yildiz y Seyrek, 2007; Perusquía y Stallone, 2010; revisado por: Kelly y Jones, 2013). Cabe decir que la primera evidencia experimental que demostró el efecto vasodilatador de la TES fue Yue *et al.*, (1995) en aorta y arteria coronaria aislada de conejo. A posteriori, numerosos estudios han demostrado que la TES actúa como un vasodilatador directo en vasos de diferentes especies, incluyendo arterias humanas: en aorta torácica de rata (Costarella *et al.*, 1996; Perusquía *et al.*, 1996; Honda *et al.*, 1999; Ding y Stallone, 2001; Montaña *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2010), y perro (Chou *et al.*, 1996); en arteria coronaria de rata (English *et al.*, 2001), cerdo (Crews y Khalil, 1999; Teoh *et al.*, 2000; Deenadayalu *et al.*, 2001, 2012), perro (Perusquía *et al.*, 2012) y humanas (Webb *et al.*, 1999); en arteria cerebral de rata (Geary *et al.*, 2000), arteria mesentérica de rata (Tepareenan *et al.*, 2002; Puttabyatappa *et al.*, 2013) y arteria carótida de conejo (Marrachelli *et al.*, 2010). También se ha demostrado que la TES induce vasodilatación en la vasculatura pulmonar de rata (English *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002), ratón (Jones *et al.*, 2003), en la circulación pulmonar humana (Smith *et al.*, 2008; Rowell *et al.*, 2009), así como en arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007; Cairrão *et al.*, 2008, 2010). Estos reportes indican un beneficio directo de la TES al regular la actividad contráctil de la vasculatura sistémica de hembras y machos, caracterizada como una acción no genómica, independiente de la interacción del andrógeno con receptores intracelulares a andrógenos y de la transcripción y síntesis de proteínas.

Es pertinente señalar que la mayoría de los estudios reportan el efecto vasodilatador no genómico ejercido solo por TES, prestando poca atención a la vasodilatación que puedan provocar otros andrógenos. A este respecto, nuestro grupo de investigación ha reportado de forma sistemática que el metabolito 5 $\beta$  reducido de la TES, 5 $\beta$ -DHT es notablemente más potente que TES para relajar la aorta de rata (Perusquía *et al.*, 1996; Perusquía y Villalón,

---

1999; Montaña *et al.*, 2008), arteria coronaria y femoral de perro (Perusquía *et al.*, 2012) y arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007). En marcado contraste, su isómero 5 $\alpha$  reducido, 5 $\alpha$ -DHT, es menos potente o equipotente a TES para relajar la aorta de rata (Ding y Stallone, 2001), arteria coronaria y femoral de perro (Perusquía *et al.*, 2012), arteria coronaria y pequeñas arterias prostáticas de cerdo (Deenadayalu *et al.*, 2001; Navarro-Dorado *et al.*, 2008) y arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007). Referente a los tetrahidro metabolitos de la TES i.e., los productos de la subsecuente 3 $\alpha$  o 3 $\beta$  hidroxilación de los dihidroderivados 5 $\alpha$  y 5 $\beta$ , han mostrado ser menos potentes que TES para inducir vasorelajación (Yue *et al.*, 1995) o equipotentes a TES en el caso de androsterona (Perusquía *et al.*, 2007). Estos hallazgos han permitido establecer que los andrógenos son compuestos vasoactivos por inducir vasodilatación, mostrando la marcada capacidad de 5 $\beta$ -DHT para inducir una aguda potencia vasorelajante, mayor a la provocada por TES e incluso que la respuesta vasodilatadora que ejercen progestinas y estrógenos (English *et al.*, 2001; Montaña *et al.*, 2008; Perusquía *et al.*, 1996; Perusquía *et al.*, 2007).

Adicionalmente al efecto vasodilatador directo ejercido por los andrógenos, éstos también son capaces de modular la síntesis y función de numerosos factores que intervienen en la regulación del tono vascular. Así, nuestro grupo de investigación ha descrito que la pérdida de hormonas sexuales altera la liberación y función de distintos mediadores celulares que conducen a una disfunción vascular. De forma más específica, en arterias de ratas macho orquidectomizadas se ha observado un incremento en la producción y efecto vasomotor de prostanoïdes vasoconstrictores (Blanco-Rivero *et al.*, 2006a, Martorell *et al.*, 2008; del Campo *et al.*, 2008; del Campo *et al.*, 2014) que contrarrestan las respuestas vasodilatadoras. También se ha observado que la orquidectomía incrementaba la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido y el peroxinitrito (Martín *et al.*, 2005; Blanco-Rivero *et al.*, 2006b) que provocan una disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), tanto de origen endotelial como neuronal. Asimismo, se ha descrito un incremento en la actividad de la proteínquinasa C (PKC) en arteria mesentérica de ratas orquidectomizadas

(Blanco-Rivero *et al.*, 2005) como consecuencia del aumento de prostanoïdes y ROS. Es decir, que la pérdida de función androgénica aumenta la producción de prostanoïdes vasoconstrictores y disminuye la biodisponibilidad del NO, lo que puede provocar aumento en el tono vascular y, por tanto, de la resistencia vascular sistémica. Es importante mencionar que la supresión de la función gonadal altera la liberación y función de distintos neurotransmisores (Sun *et al.*, 2001; Martín *et al.*, 2005; del Campo *et al.*, 2008) que, en determinados lechos vasculares como el mesentérico, ejercen importantes efectos sobre el tono vascular contribuyendo a la regulación de la presión arterial (PA) sistémica.

Además, las modificaciones en los anteriores factores mantenidas en el tiempo activan vías de señalización implicadas en procesos de proliferación celular que conducen a un engrosamiento de la capa media muscular, y por tanto al aumento de las resistencias vasculares periféricas. Así, se ha descrito la capacidad del tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) de inducir proliferación celular vía transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Gallet *et al.*, 2003), y se ha demostrado que TXA<sub>2</sub>, ROS y PKC activan diferentes metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) que provocan la transactivación del EGFR (Gao *et al.*, 2001; Oeckler *et al.*, 2003). En este sentido, se ha observado en arterias mesentéricas de ratas orquidectomizadas un engrosamiento de la capa muscular media (Martín *et al.*, 2005) que se correlaciona con una activación basal de la vía de señalización del EGFR (del Campo *et al.*, 2014). Asimismo, cultivos de células musculares lisas vasculares (CMLV) expuestos a TES han mostrado una menor activación de la vía de señalización iniciada tras la activación del EGFR (del Campo *et al.*, 2014). Estos resultados ponen de manifiesto el importante papel de los andrógenos en el mantenimiento de la estructura y función vascular, y por tanto de las resistencias vasculares periféricas, protegiendo así frente a la aparición de ECV como la HA.

### **3.2. Efecto de los andrógenos sobre la presión arterial**

Como consecuencia del marcado efecto vasodilatador inducido por los andrógenos, estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que los

---

metabolitos 5-reducidos de la TES pueden también provocar un bloqueo de la respuesta vasopresora que induce noradrenalina (NA) o Bay K8644 en ratas descerebradas, desmeduladas y vagotomizadas; donde 5 $\beta$ -DHT fue más potente que 5 $\alpha$ -DHT y que el metabolito 3 $\alpha$ ,5 $\beta$  reducido para inducir una rápida respuesta vasodepresora (Perusquía y Villalón, 2002). De forma notable, un estudio de nuestro grupo de investigación reportó que en ratas macho conscientes normotensas y ratas normotensas con testículo feminizante, la TES y 5 $\beta$ -DHT produjo una disminución de la presión arterial media (PAM); otra vez 5 $\beta$ -DHT produjo una mayor reducción de la PA en comparación a TES (Perusquía *et al.*, 2015). Además, hemos reportado que la hipertensión gravídica que se muestra en la preeclampsia de animales experimentales conscientes es notablemente disminuida por estos mismos andrógenos con una correlación igual para la efectividad de cada metabolito (Perusquía *et al.*, 2017). Estos trabajos revelan que la hipotensión *in vivo* que producen los andrógenos es resultado de su efecto vasorelajante. Sin embargo, sus posibles propiedades antihipertensivas aún no se han investigado en modelos de HA experimental en animales, lo que podría proporcionar nueva información en la etiología y el tratamiento de la HA.

Es bien conocido que a nivel mundial, la HA es un importante problema de salud pública, ya que es causa directa de discapacidad y muerte, y porque es el factor de riesgo principal de distintas ECV como la enfermedad cerebrovascular, las enfermedades coronarias, la nefropatía terminal y de la enfermedad vascular periférica (Danaei *et al.*, 2011). Durante la última década, las ECV han sido y siguen siendo la primera causa de muerte en el mundo. En 2015 provocaron más de 10 millones de fallecimientos (Organización Mundial de la Salud, OMS Enero 2017) siendo así un grave problema de salud pública a nivel mundial.

La HA es una patología que presenta elevación de la PA de forma crónica, cuyos valores son superiores a 140/90 mmHg, presión arterial sistólica/presión arterial diastólica (PAS/PAD). Se la clasifica en:

- HA esencial, de etiología desconocida y con 90-95% de incidencia.
- HA secundaria, se conoce la causa que provoca dicha elevación.

La HA se caracteriza por alteraciones en la función y estructura vascular, entre las que se incluyen disfunción endotelial, incremento en las respuestas vasoconstrictoras y aumento de la relación pared / lumen vascular (Lahera *et al.*, 1997; Rodrigo *et al.*, 1997; Briones *et al.*, 2003). Estas alteraciones son de especial relevancia en lechos vasculares de resistencia por su contribución a la regulación de la PA sistémica (Briones *et al.*, 2003; Arribas *et al.*, 2008; Yogi *et al.*, 2011). Es importante señalar que la alteración en la funcionalidad de la innervación perivascular juega un importante papel en esta patología. De hecho, numerosos estudios muestran modificaciones en la liberación y función de distintos neurotransmisores como el NO (Marín *et al.*, 2000; Ferrer *et al.*, 2004a, 2004b), la NA (Ekas y Lokhandwala, 1981; Tsuda *et al.*, 1984; Maranon y Reckelhoff, 2016; Sastre *et al.*, 2016) o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Márquez-Rodas *et al.*, 2006; González-Hernández *et al.*, 2016; Sastre *et al.*, 2016). Por este motivo, analizar el efecto de los andrógenos en la liberación y función de estos neurotransmisores también proporcionará información adicional acerca de las posibles propiedades antihipertensivas de estas hormonas.

Debido a la gran incidencia de las ECV y a que la HA es el factor de riesgo principal, la prevención, el control y la regulación de la PA debe constituir una prioridad en la población y en los organismos de salud.





## ***II. JUSTIFICACIÓN***



Debido a que la hipertensión arterial es un problema de salud pública mundial resulta muy relevante su estudio. La capacidad de los andrógenos para provocar un agudo efecto vasorelajante en tejidos aislados produce, en consecuencia, una disminución directa sobre la presión arterial. El estudio de la respuesta hipotensora de los andrógenos *in vivo* se ha investigado escasamente en animales normotensos pero no ha sido explorada en animales conscientes que cursan con hipertensión arterial, por lo cual este estudio pretende investigar su potencial respuesta antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas, conscientes, en libre movimiento, comparada con sus respectivos controles normotensos. Las evidencias obtenidas con testosterona y sus metabolitos 5-reducidos no aromatizables podrían proporcionar información relevante sobre el papel que juegan las hormonas sexuales masculinas sobre la regulación de la presión arterial y su posible mecanismo de acción. Asimismo, los datos permitirán establecer la posible relación estructura química-actividad hipotensora de los diferentes andrógenos, que pudieran revelar una respuesta antihipertensiva de los andrógenos con un gran valor terapéutico para la prevención y/o tratamiento de la hipertensión arterial.



### ***III. HIPÓTESIS***



1. Como resultado del marcado efecto vasodilatador en diferentes lechos vasculares (Costarella *et al.*, 1996, Webb *et al.*, 1999; Perusquía *et al.*, 2012) que producen testosterona y sus metabolitos 5-reducidos, se espera que la administración exógena de testosterona y sus derivados 5-reducidos pudiera causar una respuesta hipotensora *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en sus respectivos controles normotensos ratas Wistar Kyoto (WKY).

Previamente se ha mostrado que estos andrógenos pueden bloquear la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L (CCDV-L) en miocitos aislados (Scragg *et al.*, 2004, 2007; Hall *et al.*, 2006; Montaña *et al.*, 2008), por lo que es de esperarse que en las ratas hipertensas *in vivo*, la respuesta presora de Bay K8644 (agonista selectivo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de los CCDV-L) sea disminuida por el andrógeno 5 $\beta$ -dihidrotestosterona.

2. La pérdida de la función gonadal mediante orquidectomía en machos WKY (normotensos) producirá aumento de la presión arterial, siendo prevenida por la sustitución de testosterona.
3. Es de esperarse un efecto vasorelajante en la aorta torácica y arteria mesentérica aisladas de SHR y WKY con una relación de potencia semejante a la que se observe en su respuesta hipotensora *in vivo*.  
Como resultado del bloqueo de los CCDV-L por los andrógenos, es esperable una mayor sensibilidad de la contracción inducida por potasio alto que produce despolarización que la inducida por fenilefrina al efecto relajante del andrógeno.
4. Respecto al lecho mesentérico, sometido a una importante regulación nerviosa, previamente se ha demostrado que la disminución de hormonas sexuales regula la liberación/función de neurotransmisores en arterias de ratas normotensas (Martín *et al.*, 2005; Blanco-Rivero *et al.*, 2006b; del Campo *et al.*, 2008), por lo que es esperable que la liberación y/o función de los neurotransmisores NO, NA y CGRP estuviera modulada por los andrógenos, contribuyendo así al efecto antihipertensivo de los mismos.





## ***IV. OBJETIVOS***



1. Evaluar la potencial respuesta hipotensora *in vivo* en ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR) conscientes comparado con sus respectivos controles normotensos (WKY) de los andrógenos: testosterona, 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -dihidrotestosterona a diferentes dosis para obtener su relación de potencia hipotensora. Adicionalmente, se evaluará la implicación de los canales CCDV-L en el efecto antihipertensivo inducido por 5 $\beta$ -dihidrotestosterona en ratas SHR.
2. Estudiar la presión arterial de machos normotensos orquidectomizados con y sin tratamiento de testosterona durante 10 semanas.
3. Determinar el efecto vasodilatador y potencia vasorrelajante de testosterona, 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -dihidrotestosterona a diferentes concentraciones, sobre respuestas contráctiles con agentes de diferente naturaleza (KCl y fenilefrina) en la aorta torácica y arteria mesentérica aisladas de ratas machos SHR y WKY.
4. Analizar el efecto de los andrógenos sobre la función de las inervaciones nitrérgica, sensitiva y adrenérgica de la arteria mesentérica de ratas SHR y WKY. Se valorará el efecto de la testosterona, 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -dihidrotestosterona sobre la liberación y la respuesta vasomotora de los neurotransmisores NO, CGRP y NA.



## ***V. MATERIALES Y MÉTODOS***



## **1. Animales**

Se utilizaron ratas macho adultas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus respectivos controles normotensos, rata Wistar Kyoto (WKY), de entre 18-21 semanas de edad, en un intervalo de peso de 290-330 g. Las ratas se obtuvieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (número de registro: EX-021U) de acuerdo con las directivas 609/86 CEE and R.D. 233/88 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España. Las ratas fueron mantenidas en condiciones de bioterio: con temperatura constante de  $\pm 21^{\circ}\text{C}$ , ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad, recibiendo alimento y agua *ad libitum*.

Esta investigación cumple las directrices de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, publicado por: The US National Institutes of Health (NIH publication 86-23, revised 2014). El presente estudio está aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de animales de laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; y por el Comité Ético de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y por la Comunidad Autónoma de Madrid (Ref. PROEX 202/16).

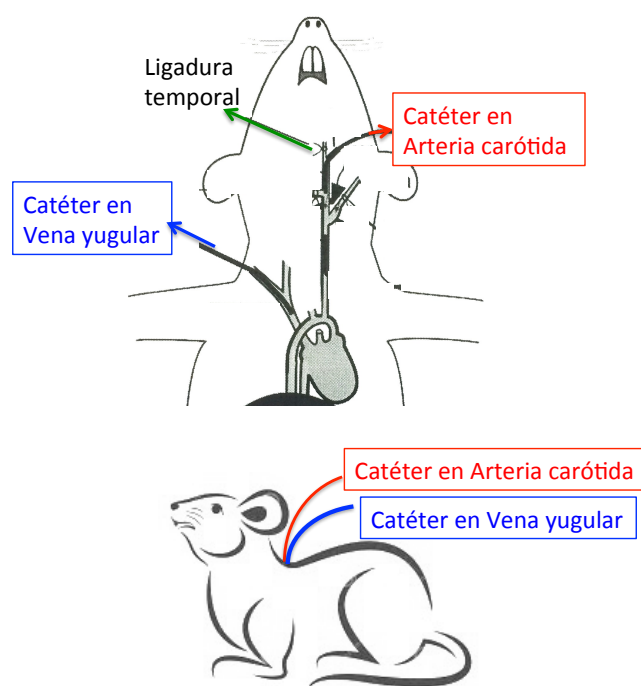
## **2. Procedimientos quirúrgicos**

### **2.1. Implantación de los catéteres**

Ratas SHR o WKY fueron anestesiadas mediante administración i.p. de 80 mg kg<sup>-1</sup> de Ketamina (Anesket®) y de 10 mg kg<sup>-1</sup> de Xilacina (Rompun®). A continuación se les rasuró el cuello y la nuca, para que en condiciones asépticas el animal fuera colocado en la mesa de cirugía en posición de decúbito para proceder a la implantación de dos catéteres.

A partir de un tubo de poliuretano (diámetro interno 0.36 mm, diámetro externo 0.84 mm, “Microrenathane”, Braintree Scientific, Inc., USA) se obtuvieron dos cánulas de 10 cm de longitud que se implantaron: una en la arteria carótida izquierda para poder registrar los parámetros hemodinámicos (presión arterial, PA y frecuencia cardíaca, FC) y otra en la vena yugular

derecha para la posterior administración del fármaco. Los catéteres se pasaron por vía subcutánea a la superficie dorsal del cuello (Figura 5). Dichos catéteres estaban protegidos mediante un chaleco de poliéster, diseñado para las ratas, el cual rodea el tórax y cuello de la rata y, que cierra con velcro.



**Figura 5.** Cateterismo arterial y venoso de las ratas para el registro de los parámetros hemodinámicos incluyendo presión arterial sistólica, diastólica, presión arterial media y la frecuencia cardíaca. El catéter insertado en la vena yugular es usado para la administración en bolo del fármaco.

## 2.2. Castración de ratas macho normotensas WKY y Wistar

Se utilizaron ratas macho normotensas de la cepa WKY y Wistar de 18 a 22 semanas de edad que fueron sometidas a orquidectomía bilateral. Los animales fueron anestesiados mediante la administración i.p. de  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de



Ketamina (Anesket®) y de 10 mg kg<sup>-1</sup> de Xilacina (Rompun®). Una vez que el animal estaba anestesiado, se rasuró la zona de la cirugía y se realizó una incisión de aproximadamente 3 cm de longitud en la piel escrotal, para extraer el testículo y visualizar el cordón espermático. El cordón espermático fue ligado con hilo de seda (Surgical®; calibre 3/0), para ocluir el flujo sanguíneo e inmediatamente se cortó el cordón espermático. Para retirar el otro testículo se siguió el mismo procedimiento. Finalmente, las zonas de incisión (escroto) se suturaron con hilo de seda (LOOK®; calibre 6/0) y se aplicó una solución antiséptica en spray (VeteriBac®).

Inmediatamente después de la orquidectomía, las ratas WKY orquidectomizadas fueron divididas en dos grupos:

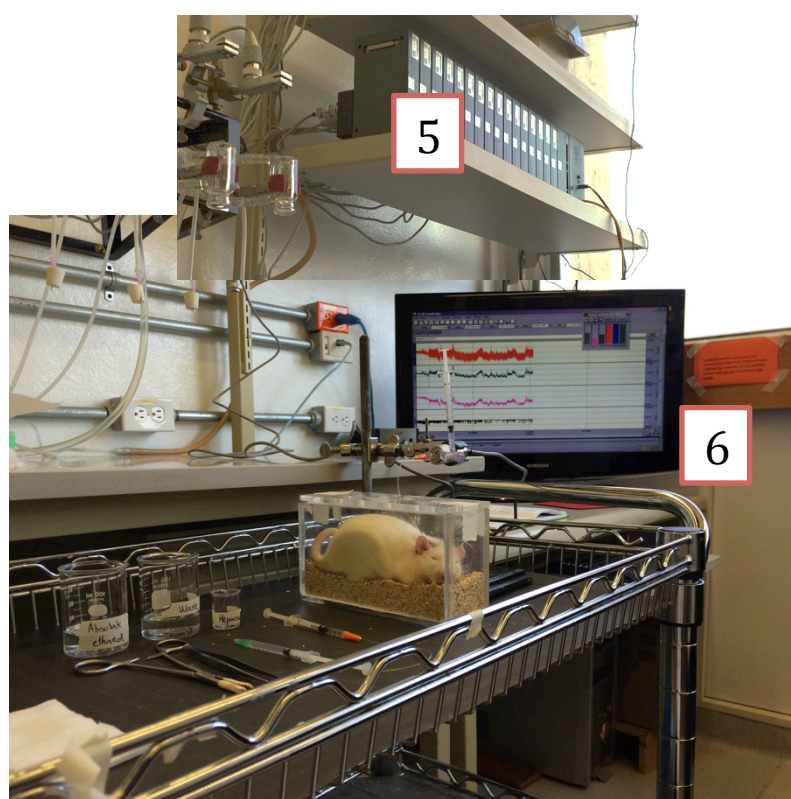
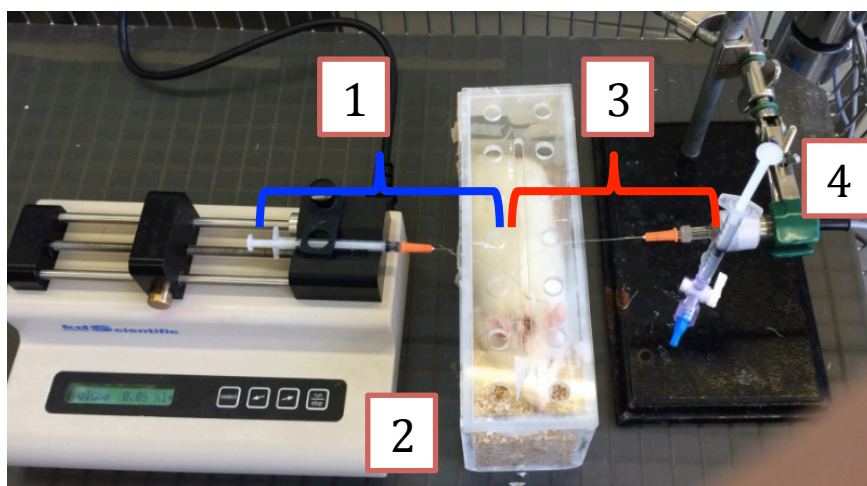
- Grupo 1, WKY orquidectomizadas (oWKY).
- Grupo 2, oWKY con tratamiento de reemplazo de testosterona (oWKY+TES), a las cuales se les administró semanalmente por vía s.c. 8.75 mg kg<sup>-1</sup> de propionato de testosterona disuelto en aceite de oliva extra virgen. La duración del tratamiento fue de 10 semanas.

La PA de todos los grupos de animales fue registrada por pletismografía cada semana a lo largo del tratamiento.

### **3. Registro de los parámetros hemodinámicos**

#### **3.1. Evaluación del efecto de los andrógenos sobre los parámetros hemodinámicos**

Después que las ratas SHR y WKY se recuperaron de la cirugía realizada para la implantación de los catéteres (24-48 h), se colocaron en una caja de plexiglás transparente que les permitía moverse libremente y aclimatarse a las condiciones experimentales durante 90 min. Para realizar el registro, el catéter de la arteria carótida fue conectado a un transductor de presión (Grass P23 XL) adaptado a un sistema de registro MP150 (Biopac Systems Inc., CA) acoplado con el software AcqKnowledge para la adquisición y el análisis de los datos (Figura 6).



**Figura 6.** Sistema invasivo para registro de los parámetros hemodinámicos en el animal consciente. Se introdujo a la rata dentro de una caja de restricción de movimientos, a continuación: la cánula de la vena yugular (1) se conectó a una jeringa para proceder a la administración del compuesto con ayuda de una bomba de infusión digital (2), y la cánula de la arteria carótida (3) se conectó a un transductor de presión (4) que es un sistema analógico digital adaptado al sistema de registro MP150 (Biopac Systems Inc., CA., EUA) (5) y a un ordenador conectado a una pantalla mediante la que es posible la visualización del registro (6).

Una vez que los parámetros hemodinámicos habían permanecido estables durante un período de al menos 90 min, es decir; los valores basales de presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM), en mmHg y, frecuencia cardíaca (FC; latidos  $\text{min}^{-1}$ ) fueron registrados de manera continua durante el experimento y sus valores fueron calculados mediante el software AcqKnowledge. En todos los grupos experimentales, el registro continuó durante al menos 90 min después de que se administrase la dosis más elevada de andrógenos. Los valores hemodinámicos después de cada dosis fueron comparados con los valores basales para determinar los cambios en la PA; tanto en valor absoluto ( $\Delta$  mmHg) como relativizado al control (%), y en la FC ( $\Delta$  latidos  $\text{min}^{-1}$ ).

*Grupo 1 y 2.* Después de los 90 min del período de estabilización (valores basales), se realizaron las curvas dosis-respuesta para cada andrógeno en las ratas SHR y WKY (solamente se administró un único andrógeno a cada animal). Los andrógenos fueron administrados en bolo por vía intravenosa (a través del catéter insertado en la vena yugular) a diferentes dosis acumulativas log -1, 0, 1.0 y 2.0  $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , las cuales fueron administradas durante un período de un minuto con ayuda de una bomba de infusión digital programable (KD Scientific, MA; Kds 100) con un intervalo de ~ 20 min entre dosis.

*Grupo 3.* En este grupo control se realizaron los experimentos para evaluar el efecto del vehículo utilizado para disolver los andrógenos sobre la PA y FC de ratas SHR y WKY. Para ello, se administró en bolo el volumen equivalente del vehículo a cada una de las dosis de andrógeno administrado (etanol absoluto, ETOH; en todas las dosis administradas el volumen no excedió los 0.5 ml de ETOH por cada rata) y se siguió el mismo esquema de administración en el que las diferentes dosis de los andrógenos fueron administradas.

*Grupo 4.* En este grupo experimental se evaluó el efecto del andrógeno  $5\beta$ -DHT sobre la respuesta presora *in vivo* inducida por Bay K8644 (una

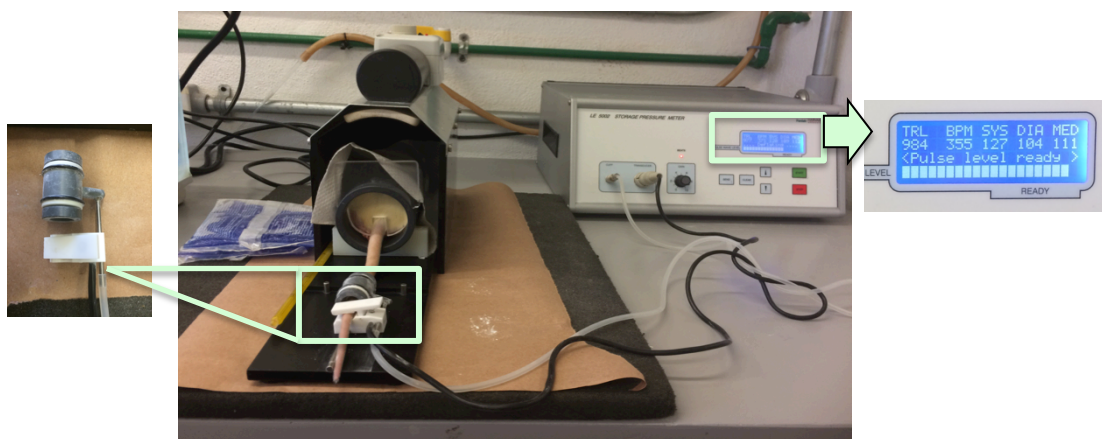
---

dihidropiridina agonista de los CCDV-L). Después del período de estabilización (valores basales), en las ratas SHR, se administró  $100 \text{ nmol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  de Bay K8644 que provoca la contracción del músculo liso vascular por incremento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de los CCDV-L situados en la membrana de esas células musculares. Cuando la respuesta presora se mantuvo estable,  $5\beta$ -DHT (seleccionado por ser el andrógeno más potente y eficiente en los experimentos del Grupo 1), se administró en bolo a través de la vena yugular a la dosis de  $2.0 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

### **3.2. Efecto de la orquidectomía sobre la presión arterial de ratas normotensas (WKY y Wistar)**

Para registrar la PA en las ratas WKY orquidectomizadas (oWKY), Wistar orquidectomizadas y a oWKY+TES con terapia de reemplazo de TES se utilizó el método no invasivo indirecto de pletismografía caudal (Byrom y Wilson, 1938). Consta de un manguillo caudal para roedores adaptado a un equipo electrónico de medición (modelo LE 5002 Storage Pressure Meter marca PanLab HARVARD APPARATUS, España). La PA fue medida antes de la orquidectomía (día 0) y posteriormente censada semanalmente, durante las 10 semanas siguientes en cada grupo. Para ello, todas las ratas empleadas para este estudio se entrenaron previamente a las condiciones de registro durante al menos 2 semanas durante 20 min/día. Previo a la medición de la PA, a cada animal se le provocó un aumento de la temperatura corporal con el objetivo de conseguir vasodilatación de la arteria caudal, introduciendo a los animales en una jaula precalentada a  $32^{\circ}\text{C}$  durante 20 min mediante una fuente de calor (calentador de resistencia). Después de que las ratas permanecieran 20 min a  $32^{\circ}\text{C}$ , cada rata fue introducida en un tubo de acrílico ( $26 \times 7 \times 6 \text{ cm}$ ) que restringía el movimiento de los animales durante la medición y dejaba la cola libre para colocar el manguillo (*tail cuff*) y censar la PA. Dentro de la unidad de aislamiento (PanLab) en la que también se mantenía la temperatura constante a  $32^{\circ}\text{C}$ , el manguillo (*tail cuff*) fue conectado a un transductor que detectaba y enviaba la señal al aparato para registrar; PAS/PAD y PAM en mmHg. Se realizaron cinco mediciones en cada rata y se calculó el promedio de aquellas tres lecturas cuya diferencia no

excediera de 2 a 5 mmHg, siendo el valor obtenido el que se consideró como la PA para ese animal (Figura 7).



**Figura 7.** Sistema de registro de la presión arterial (PA) mediante pletismografía caudal. La rata fue introducida en un tubo de acrílico que restringía sus movimientos, y en la cola se colocó un manguillo que estaba conectado al sistema de registro para la medición de los parámetros hemodinámicos. Se realizó un máximo de 5 mediciones en cada animal para obtener un promedio.

#### 4. Aislamiento y preparación del tejido vascular

Ratas SHR y WKY de 18 a 21 semanas de edad fueron anestesiadas ligeramente con éter y a continuación sacrificadas por dislocación cervical. Inmediatamente después, en un grupo de ratas, se abrió la cavidad torácica y la cavidad abdominal para proceder a la extracción de la aorta torácica (AT) descendente y, en otro grupo de animales, sacrificados de la misma manera, se disecó la arteria mesentérica (AM) superior. Cada uno de los vasos fue colocado en una caja de Petri de doble pared que es conectada a un baño recirculador que contenía solución Krebs-Henseleit (KHS) con la siguiente composición (en mM): glucosa (12),  $\text{NaHCO}_3$  (24.9), NaCl (119), KCl (4.74),

---

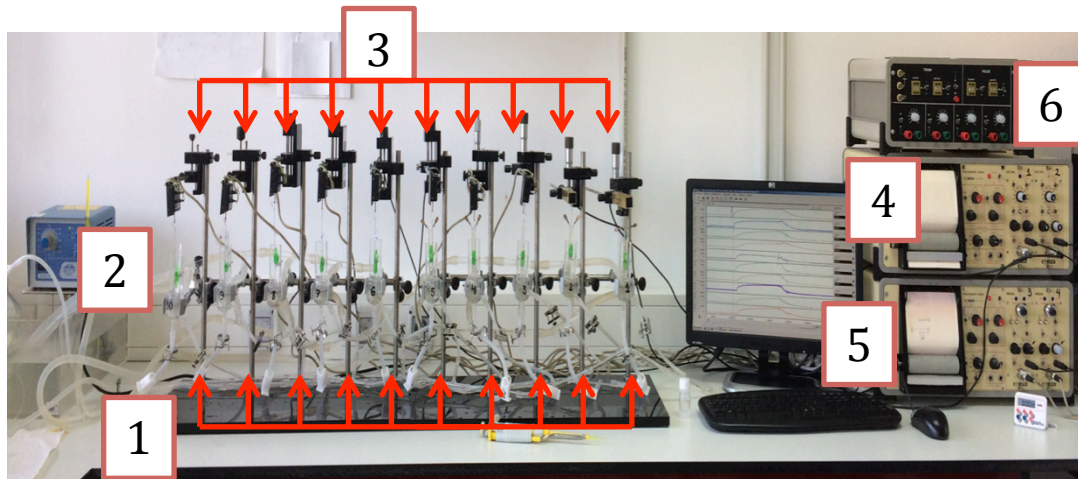
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.18), MgSO<sub>4</sub> (1.18) y CaCl<sub>2</sub> (2.5); a 37° C y el pH se ajustó a 7.4 mediante burbujeo constante de gas carbónico (5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub>). Ambas arterias fueron limpiadas cuidadosamente de tejido conectivo y adiposo sin dañar el endotelio vascular y manteniendo la integridad de la pared vascular. La región torácica media de la AT fue cortada en anillos de ~1 cm de longitud, y la AM se cortó transversalmente en anillos de ~0.5 cm de longitud.

#### ***4.1. Registro de la tensión isométrica***

Cada anillo vascular fue montado en un baño de órganos de 5 mL que contenía solución KHS a 37 °C, burbujeada continuamente con gas carbónico (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>: 95/5), lo que le confiere un pH de 7.4. A través de la luz vascular se introdujeron dos ganchos de acero inoxidable paralelos en forma de “L”. Uno de los ganchos se fijó a la pared de la cámara mientras que el otro era móvil y estaba sujetado a un transductor de fuerza isométrica (FTO3C, Grass Instrument, Quincy, MA, U.S.A.) que detectaba las señales mecánicas del tejido y las transformaba en señales eléctricas para ser enviadas a un polígrafo (79 Grass Instrument, Quincy, MA, U.S.A.) que a su vez estaba conectado a un sistema computacional de registro (Figura 8).

Prevía calibración del aparato, y una vez que los anillos arteriales estaban montados en el sistema de registro isométrico, se sometió a los anillos aórticos a una tensión de 1 g (10 mN), y a los anillos mesentéricos a una tensión de 500 mg (5 mN) la cual dependía del diferente calibre de cada vaso y que fue mantenida durante todo el experimento. Bajo estas condiciones, la tensión fue reajustada periódicamente hasta que se estabilizaban en dicha tensión (período de estabilización). Durante el período de estabilización (90-120 min), previo al inicio de los experimentos, la solución en la que estaban contenidos los anillos arteriales se renovó cada 15 min.





**Figura 8.** Sistema de registro de tensión isométrica para aorta torácica y arteria mesentérica aislada. (1) Baño de órganos que contienen solución Krebs-Henseleit a 37°C burbujeado con carbógeno; (2) Baño recirculador de agua para mantener la temperatura a 37°C en el baño de órganos; (3) Transductores de tensión; (4) Polígrafo; (5) Sistema computacional que registra la actividad contráctil y relajante del tejido aislado y (6) Estimulador eléctrico.

A continuación, se comprobó la integridad funcional de todos los anillos arteriales analizando la respuesta contráctil inducida con solución de alto potasio (KCl 60 mM: solución Krebs-Henseleit con una sustitución equimolecular de 64.7 mM NaCl por 60 mM de KCl). La solución despolarizante (KCl) produjo una contracción tónica sostenida en ambos vasos, AT y AM, dicha contracción fue tomada como control para verificar la viabilidad del tejido. Transcurridos 10 min desde la inducción de la contracción, los tejidos fueron repolarizados mediante un recambio de la solución despolarizante por KHS, lo que permitió que recuperasen su tono basal. Las preparaciones que desarrollaron una tensión inferior a 1 g fueron descartadas. Se dejaron transcurrir 20 min antes de inducir una segunda contracción con la solución despolarizante (KCl 60 mM) con el objetivo de verificar la reproducibilidad de la respuesta del tejido. Después del segundo estímulo contráctil inducido por KCl 60 mM, los tejidos fueron lavados con solución KHS.

---

Aunque varias líneas de investigación han demostrado que la vasorelajación inducida por TES es un mecanismo endotelio independiente (revisado en Perusquía *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2003; Perusquía *et al.*, 2010), en el presente estudio se utilizaron preparaciones con endotelio, ya que factores endoteliales como el NO, entre otros, podrían desempeñar un papel modulador en las respuestas despolarizantes y en las mediadas por activación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  que, en vasos sin endotelio, podrían verse afectadas (Sánchez-Ferrer y Marín, 1990).

Transcurridos 30 min desde que se repolarizó el tejido con solución KHS, se analizó farmacológicamente la presencia de endotelio en la AT y la AM. Para ello, los anillos fueron contraídos con fenilefrina (Phe) 1  $\mu$ M, y sobre el tono sostenido de la contracción, se adicionó acetilcolina (ACh) 20  $\mu$ M que produce una respuesta relajante si el segmento posee endotelio. Se consideró con endotelio funcional cuando la relajación era mayor de un 70 % respecto a la contracción previa. Posteriormente, se realizaron tres lavados de las arterias con solución Krebs-Henseleit, con el objetivo de retirar los compuestos. Se esperó a que los anillos arteriales alcanzasen su tono basal dejando transcurrir siempre un tiempo mínimo de 60 min antes de proceder al estudio del: 1) efecto vasodilatador de los andrógenos, 2) efecto de los andrógenos sobre las respuestas vasomotoras inducidas por los neurotransmisores NO, CGRP y NA, y 3) efecto de los andrógenos sobre la respuesta vasomotora inducida por estimulación eléctrica (EE).

#### **4.1.1. Efecto vasodilatador de los andrógenos**

Para evaluar dicho efecto, diferentes anillos arteriales de ratas SHR o WKY fueron contraídos con una solución despolarizante (KCl 60 mM) mientras otros anillos fueron contraídos con un agonista de receptores  $\alpha$  adrenérgicos (Phe, 1  $\mu$ M). Después que el tono de la contracción se mantuviera estable (~15 min), se realizaron curvas concentración-respuesta a cada uno de los andrógenos (TES, 5 $\alpha$ -DHT o 5 $\beta$ -DHT) a diferentes concentraciones (0.1, 1.0, 10 y 100  $\mu$ M) aplicadas de forma acumulativa. Solamente se realizó un tratamiento en cada segmento arterial, lo que significa que cada curva



concentración-respuesta para cada andrógeno fue realizada de manera independiente en muestras de diferentes animales. En otro grupo de experimentos (grupo control del vehículo), en anillos de AT y de AM precontraídas con KCl o Phe se les adicionó el vehículo en el que fueron diluidos los andrógenos (ETOH), aplicando el volumen equivalente de ETOH para cada concentración de andrógeno usada, el cual nunca excedió un volumen final de 0.1% v/v. El efecto de cada andrógeno o del vehículo fue evaluado cada 15 min (tiempo necesario para alcanzar un efecto de vasorelajante estable) durante 70 min en anillos independientes provenientes de un individuo diferente ( $n \geq 6$  ratas en experimentos independientes). Para finalizar, los anillos arteriales fueron lavados tres veces con KHS, retirando así todos los residuos del compuesto y permitiendo que los anillos alcanzasen su tono basal. A continuación se esperó 60 min antes de inducir una última contracción con KCl (60 mM) que fue mantenida durante 40 min para verificar la reversibilidad del efecto vasodilatador de los andrógenos.

Los datos fueron evaluados midiendo la amplitud (en mg) de la contracción que indujo Phe o KCl (respuesta control, 100% de la contracción inducida) y comparándola con la amplitud de la contracción después del efecto ejercido por cada concentración de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT. El efecto vasodilatador fue expresado en términos de porcentaje de relajación respecto a la contracción inducida por KCl o Phe. Posteriormente, con los datos obtenidos se construyeron individualmente las curvas concentración-respuesta vasodilatadora, se obtuvo la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>; concentración del andrógeno necesaria para inhibir al 50 % la respuesta vasocontráctil máxima), y se calculó el efecto relajante máximo (E<sub>max</sub>; efecto relajante del andrógeno a la concentración más alta utilizada, 100  $\mu$ M) para cada andrógeno como ha sido descrito en estudios previos (Perusquía *et al.*, 1996, 2007, 2012; Perusquía y Villalón, 2002; Montaña *et al.*, 2008). Finalmente, el efecto de cada andrógeno sobre la contracción inducida por KCl y Phe fue comparado en AT y AM de ratas SHR y WKY, como se explica a continuación:

- Las curvas concentración-respuesta para cada andrógeno fueron comparadas en AT y en AM de ratas SHR y WKY, así como la potencia vasorelajante (CI<sub>50</sub>) de cada andrógeno sobre la contracción inducida por KCl

---

o Phe. También se comparó en arterias de ambas cepas la sensibilidad de la contracción inducida por KCl o Phe a la relajación inducida por cada uno de los andrógenos, utilizando la eficacia de relajación ( $E_{max}$ ).

- En diferentes anillos arteriales de diferentes animales, el grupo control del vehículo (volumen equivalente de ETOH para cada concentración de andrógeno usada) fue estudiado en AT y AM provenientes de ambas cepas y precontraídos con KCl o Phe.

#### **4.1.2. Efecto de los andrógenos sobre la respuesta vasomotora de NO, CGRP y NA**

Para evaluar el efecto de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT sobre las respuestas vasomotoras de los neurotransmisores NO, CGRP y NA (cuya liberación fue analizada en otro grupo de arterias), se realizaron curvas concentración-respuesta a estos compuestos después de la incubación de los anillos de AM procedentes de ratas SHR o WKY con 10 nM de cada uno de los andrógenos durante 30 min. La concentración de los andrógenos (10 nM) fue elegida en base a resultados previos que mostraban que la incubación de CMLV con TES (10 nM) disminuía la liberación de TXA<sub>2</sub> y la activación del EGFR (del Campo *et al.*, 2014). El tiempo de incubación con los andrógenos (30 min) es el utilizado de forma habitual en el laboratorio para analizar efectos rápidos no genómicos sobre diversos parámetros. Paralelamente, en otros anillos arteriales se analizó el efecto del vehículo en el que fueron diluidos los andrógenos (ETOH). En todas las condiciones experimentales se realizaron curvas concentración-respuesta a:

- Nitroprusiato de sodio (NPS): Se utilizó este compuesto como donante de NO, para analizar el efecto vasodilatador del NO. En arterias precontraídas con NA (1  $\mu$ M) se realizaron curvas concentración-respuesta a NPS (1 pM - 10  $\mu$ M) adicionándose cada concentración de forma creciente y acumulativa.

- CGRP: Para analizar el efecto vasodilatador del CGRP se realizaron curvas concentración-respuesta a CGRP (1 pM - 0.1  $\mu$ M) en arterias precontraídas con NA.

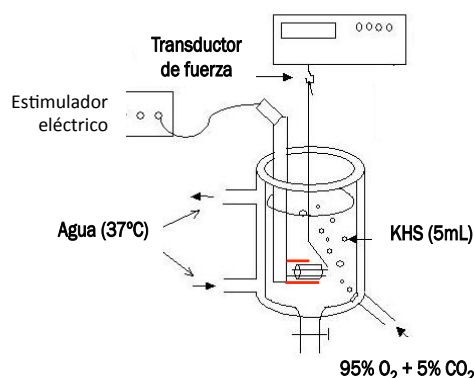
- NA: Se analizó la respuesta vasoconstrictora mediante la realización de curvas concentración-respuesta a NA (1 nM - 10  $\mu$ M).

El efecto de los compuestos utilizados fueron evaluados cada ~5 min (tiempo necesario para alcanzar un efecto vasodilatador o vasoconstrictor estable) en anillos independientes provenientes de un individuo diferente. Finalmente, los anillos arteriales fueron lavados con KHS.

Las respuestas vasodilatadoras inducidas por NO y CGRP fueron evaluadas comparando la amplitud (en mg) de la contracción que indujo NA (100% de la contracción) con la amplitud alcanzada por cada concentración de NO o CGRP. El efecto vasodilatador se expresó en términos de porcentaje de inhibición de la contracción inducida sobre NA (% de relajación). La respuesta vasoconstrictora inducida por NA se evaluó midiendo la amplitud (en mg) alcanzada en cada concentración de NA adicionada comparándola con la amplitud que indujo KCl (100% de la contracción). El efecto contráctil inducido por NA fue expresado en términos de porcentaje de contracción respecto a la respuesta contráctil inducida por KCl.

#### ***4.1.3. Efecto de los andrógenos sobre la respuesta inducida por estimulación eléctrica***

Para evaluar el efecto de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT sobre la respuesta vasomotora inducida por EE, se procedió como anteriormente se ha descrito para el montaje de anillos arteriales en un baño de órganos, salvo que estos anillos de AM procedentes de ratas SHR y WKY fueron colocados entre dos electrodos de platino conectados a un estimulador eléctrico (Grass model S44) (Figuras 8 y 9). Estos anillos arteriales se incubaron durante 30 min con cada uno de los andrógenos en estudio (TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT) a una concentración de 10 nM.



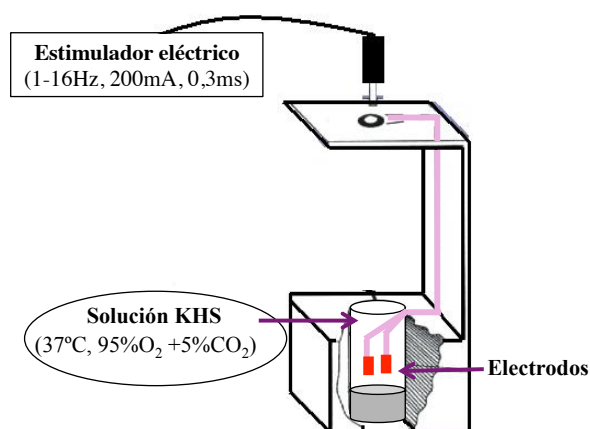
**Figura 9.** Disposición en el baño de órganos de un anillo de arteria mesentérica entre dos electrodos de platino. En líneas rojas están representados los dos electrodos de platino que están conectados al estimulador eléctrico.

Tras los 30 min de incubación, se procedió a la aplicación de los estímulos eléctricos, según los siguientes parámetros: 200 mA y 0.3 ms a frecuencias crecientes (1, 2, 4, 8 y 16 Hz) durante 30 s para cada frecuencia y dejando que el segmento alcanzase su tono basal entre la aplicación de una frecuencia y la siguiente (aproximadamente 1 min) (Martín *et al.*, 2005; Aras-López *et al.*, 2007). Procedente de cada animal, también se trabajó con anillos arteriales control (expuestos al vehículo, ETOH, durante 30 min), en los que se realizó la curva frecuencia-respuesta inducida por EE.

La respuesta contráctil inducida por la aplicación de estímulos eléctricos fue evaluada midiendo la amplitud (en mg) del punto máximo de contracción alcanzado por cada una de las frecuencias aplicadas y se expresó en porcentaje de la contracción inducida por 60 mM KCl (100% de la contracción).

#### 4.2. Liberación de neurotransmisores

Para determinar la liberación de los neurotransmisores NO, CGRP y NA de la inervación perivascular de la AM inducida por EE, diferentes anillos de AM procedentes de ratas SHR y WKY fueron estabilizados en solución Krebs-Henseleit a 37 °C burbujeada con gas carbógeno durante 45 min (período de estabilización). A continuación, los anillos arteriales fueron sumergidos en una cámara de estimulación que contenía 500  $\mu$ L de solución Krebs-Henseleit y disponía de dos electrodos de platino paralelos conectados a un estimulador eléctrico (Grass model S44) (Figura 10). Tras dos períodos de lavado realizados cada 10 min, el medio fue recogido y congelado rápidamente a -80°C para ser almacenado y medir con posterioridad la liberación basal de NO, CGRP y NA. La cámara se rellenó con solución Krebs-Henseleit y se procedió a la aplicación de estímulos eléctricos (200 mA, 0.3 ms, durante 30 s) a frecuencias crecientes (1, 2, 4, 8 y 16 Hz) a intervalos de 1 min entre ellos (tiempo requerido para que el anillo arterial recupere su tono basal tras EE). Inmediatamente después, el medio fue recogido, congelado a -80°C y almacenado para la posterior determinación de NO, CGRP y NA inducida por EE.



**Figura 10.** Cámara utilizada en los experimentos de liberación de neurotransmisores inducida por estimulación eléctrica (EE). Los anillos de arteria mesentérica se colocaron entre los dos electrodos de platino (indicados en líneas rojas) que están conectados al estimulador eléctrico. La EE tuvo lugar mediante la aplicación de pulsos de 0.3 ms de duración, 200 mA, a 1, 2, 4, 8 y 16 Hz de frecuencia, durante 30 s.

---

En otros segmentos arteriales procedentes del mismo animal, se analizó el efecto de cada uno de los andrógenos (TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT; 10 nM) así como el efecto del vehículo en el que los andrógenos fueron diluidos (ETOH) sobre la liberación basal e inducida por EE de NO, CGRP y NA. El andrógeno, o el volumen equivalente de ETOH, se adicionó al baño 30 min antes del inicio de la curva frecuencia-respuesta y previamente a la EE se recogió el medio para la posterior medición de la liberación basal de NO, CGRP y NA. A continuación se repuso el medio en presencia del andrógeno o ETOH, y se procedió a la EE, después de la cual el medio fue recogido para la medición de la liberación inducida por EE de NO, CGRP y NA.

Para medir la producción de NO, se utilizó la sonda fluorescente 4,5-diaminofluorescencia diacetato (DAF-2 DA) como ya ha sido descrito en estudios previos (Martín *et al.*, 2005; Blanco-Rivero *et al.*, 2007; del Campo *et al.*, 2008; Villalpando *et al.*, 2015). Este compuesto penetra en las células, donde es hidrolizado y transformado en 4,5-diaminofluoresceína (DAF2). Éste a su vez reacciona con el NO para formar el producto fluorescente triazolfuoresceína (DAF-2T), cuantificable mediante un espectrofluorímetro (LS50 Perkin Elmer instruments, FL WINLAB Software). Por lo tanto, las arterias, después del período de estabilización, se incubaron con 0.5  $\mu$ M DAF-2 DA durante 45 min en una solución que contenía (en mM): NaCl (119), ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N-2-etano-sulfónico (HEPES) (20), CaCl<sub>2</sub> (1.2), KCl (4.6), MgSO<sub>4</sub> (1), NaHCO<sub>3</sub> (5), glucosa (5.5), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.4), Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.15) (pH 7.4). Tras 30 min de incubación con el andrógeno o ETOH, se procedió a la recogida de los medios que contenían la liberación basal y estimulada de NO, tal y como se ha explicado anteriormente.

Para medir la liberación de CGRP y NA se utilizaron los correspondientes kits de enzimo-inmunoensayo: Noradrenaline Research EIA (Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany) y CGRP Research EIA (SPI-BIO, Massy, France). La determinación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante correspondiente a cada uno de los kits.

La liberación de cada uno de los neurotransmisores se expresó como la relación entre la liberación inducida por EE y la liberación basal.

### **5. Compuestos químicos utilizados**

Los productos: Hidrocloruro de Fenilefrina (Phe), Cloruro de Acetilcolina (ACh), L-Noradrenalina (NA), Nitroprusiato de sodio (NPS), Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (en inglés CGRP), Testosterona (TES) (17 $\beta$ -hidroxi-4-androsten-3-ona), 5 $\alpha$ -DHT (17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona), Bay K8644 (Ácido 3-piridinacarboxílico 1,4-dihidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-(2-(trifluorometil) fenil) éster metílico), Propionato de Testosterona (17 $\beta$ -hidroxi-4-androsten-3-ona, 17-propionato) se obtuvieron de SIGMA.

Los productos: 5 $\beta$ -DHT (17 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -androstan-3-ona) se obtuvieron de STERALOIDS.

TES, 5 $\alpha$ -DHT, 5 $\beta$ -DHT y Bay K8644 fueron disueltos en ETOH y se mantuvieron a una temperatura de 4°C para evitar la evaporación del ETOH. Separadamente se prepararon en una solución stock en ETOH y después se hicieron diluciones seriadas en ETOH para conseguir la concentración requerida para cada experimento. El Propionato de Testosterona fue disuelto en aceite de oliva extra virgen y mantenido a temperatura ambiente.

A excepción de los andrógenos y del Bay K8644, el resto de los compuestos utilizados fueron disueltos en agua bidestilada y se prepararon soluciones stock (10 mM) para ser almacenadas a -20° C, preparándose las diluciones correspondientes en solución fisiológica de Krebs-Henseleit en el momento de su utilización. Además, Phe, ACh y NA se mantuvieron en frasco ámbar por ser compuestos fotosensibles.

### **6. Presentación de los datos y análisis estadístico**

Respecto a los experimentos de evaluación de la PA en ratas SHR y WKY por el método invasivo, solamente se obtuvo una curva-dosis respuesta por cada animal, lo que implica que las curvas dosis-respuesta para cada andrógeno se determinaron de manera independiente en diferentes animales. La disminución de la PA en mmHg observada en los grupos en los que se realizaron las curvas dosis-respuesta para cada andrógeno (Grupos 1 y 2), se evaluó comparando cada potencia y eficacia. La potencia fue calculada como la dosis efectiva 50 o dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>; dosis de andrógeno requerida

---

para inhibir el 50 % de los valores basales de la PA). La  $DE_{50}$  fue calculada mediante regresión lineal a partir de las curvas dosis-respuesta obtenidas por cada animal y reportada como  $\log DE_{50}$ . La eficacia de cada andrógeno para disminuir la PA fue evaluada por el efecto máximo ( $E_{max}$ ; respuesta máxima del andrógeno obtenida a la dosis más alta probada:  $\log 2.0 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) de cada andrógeno. Los valores de  $DE_{50}$  y  $E_{max}$  para cada andrógeno fueron comparados entre los diferentes grupos (SHR, WKY, SHR control-vehículo y WKY control-vehículo). Para comparar  $DE_{50}$  y  $E_{max}$  entre los grupos, se utilizó una ANOVA de dos vías (SHR o WKY vs. andrógeno) seguido de la prueba de Dunnett. Para evaluar el efecto del vehículo utilizado para disolver los andrógenos sobre la PA (Grupo 3) y el efecto del andrógeno  $5\beta$ -DHT sobre la respuesta presora *in vivo* inducida por Bay K8644 (Grupo 4), se comparó dicho efecto con su respectivo valor control de PA. La prueba estadística *t* de Student no pareada fue utilizada para comparar las respuestas entre dos grupos.

Para evaluar las diferencias en: a) la PA en respuesta a diferentes dosis de TES,  $5\alpha$ -DHT o  $5\beta$ -DHT; b) la PA inducida por la orquidectomía en ausencia y en presencia de terapia de reemplazo de TES; c) el efecto vasodilatador inducido por diferentes concentraciones de TES,  $5\alpha$ -DHT o  $5\beta$ -DHT en arterias precontraídas con KCl o Phe; d) el efecto de los andrógenos sobre (i) la respuesta vasodilatadora inducida por NPS y CGRP, (ii) la respuesta vasoconstrictora inducida por NA y EE, y (iii) la liberación de los neurotransmisores NO, CGRP y NA, se utilizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido del test post hoc de Tukey para identificar diferencias entre dos medias.

La potencia vasodilatadora de cada andrógeno fue evaluada mediante el cálculo de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ; concentración de andrógeno necesaria para inhibir al 50 % la contracción inducida por KCl o Phe), calculada por regresión lineal a partir de cada curva concentración-respuesta. Los valores de  $CI_{50}$  fueron usados para comparar la potencia vasorrelajante inducida por cada andrógeno. La potencia relativa ( $CI_{50}$ ) fue calculada a partir de los valores de  $CI_{50}$  por la fórmula:  $CI_{50} \text{ TES} / CI_{50} \text{ del andrógeno}$ , asumiendo un valor de 1.0 para TES. De forma similar, la eficacia



relativa se obtuvo a partir de los valores de  $E_{\max}$  mediante la fórmula:  $E_{\max}$  andrógeno /  $E_{\max}$  TES, asumiendo un valor de 1.0 para TES. Para comparar la  $Cl_{50}$  y  $E_{\max}$  entre los grupos se utilizó ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Tukey para identificar diferencias entre dos medias.

Todos los resultados se presentaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). En todas las gráficas “n” representa a un único animal. La significancia se aceptó a valores de  $p < 0.05$ . Los análisis estadísticos y la elaboración de las gráficas se realizaron mediante el programa estadístico GraphPad PRISM® (Versión 6.01).



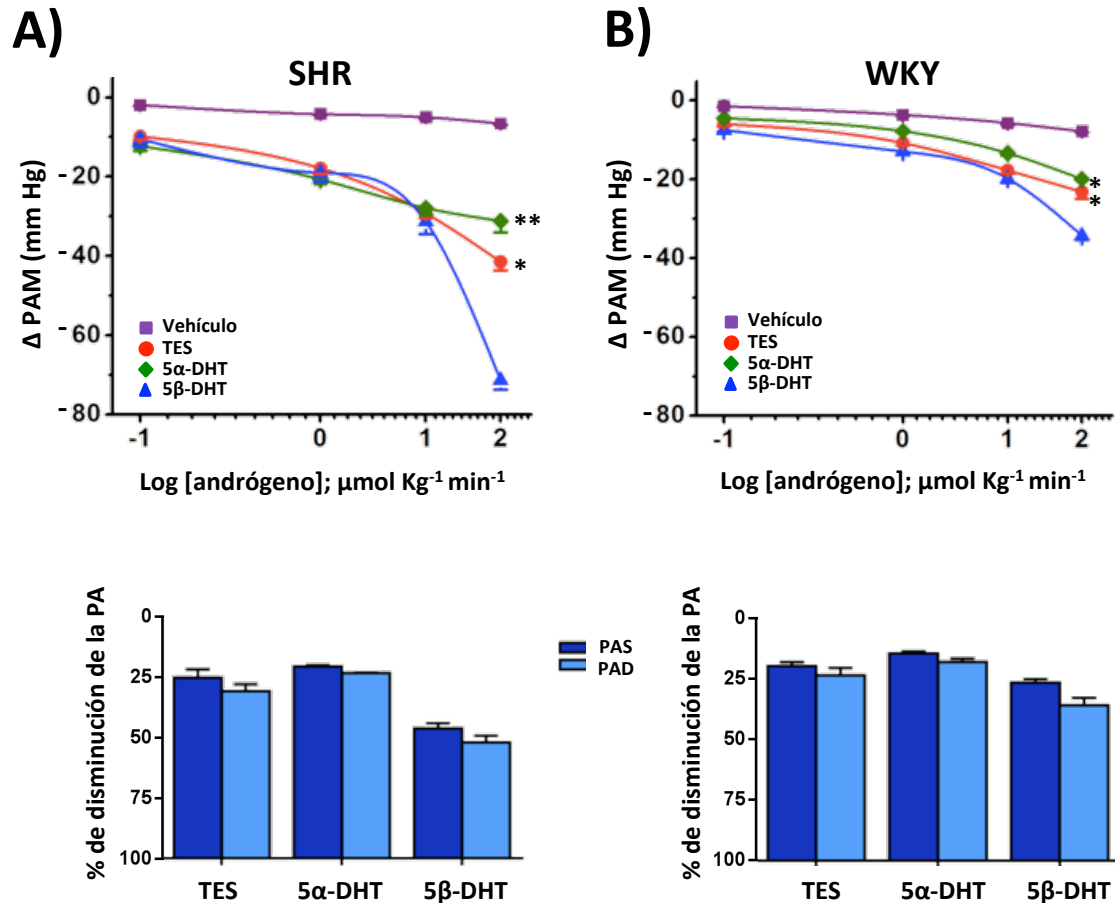
## ***VI. RESULTADOS***



## **1. Experimentos in vivo en animales conscientes**

### **1.1. Efecto antihipertensivo de los andrógenos en ratas espontáneamente hipertensas**

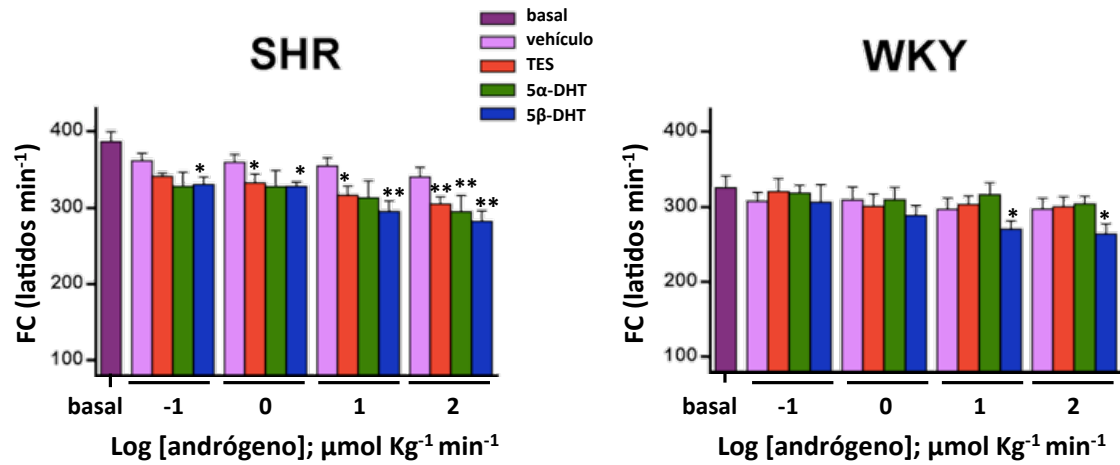
La administración i.v. de los andrógenos TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT (log -1, 0, 1.0 y 2.0  $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) provocó una disminución, dosis dependiente, de la PAM en SHR, mientras que el mismo volumen del vehículo (ETOH) no modificó significativamente la PA ( $p > 0.05$ ) (Figura 11A). La respuesta inducida por cada andrógeno fue significativamente diferente a la inducida por el vehículo (ETOH, grupo control) a todas las dosis probadas ( $p < 0.01$ ). La potencia de cada andrógeno fue evaluada en relación a los valores de la  $\text{DE}_{50}$  *i.e.*, la dosis de andrógeno requerida para inhibir el 50 % de los valores basales de la PA. Así, 5 $\beta$ -DHT fue 2.1 veces más potente que TES, mientras que 5 $\alpha$ -DHT fue 0.6 veces menos potente que TES (Tabla 1). Asimismo, 5 $\beta$ -DHT mostró la mayor eficacia antihipertensiva, seguido por TES y 5 $\alpha$ -DHT. La reducción de la PA por los andrógenos fue inmediata ( $\sim 10$  min) y parcialmente reversible, con un orden de potencia: 5 $\beta$ -DHT > TES > 5 $\alpha$ -DHT; y un orden de eficacia: 5 $\beta$ -DHT > TES = 5 $\alpha$ -DHT (ver Tabla 1). No se observaron diferencias en la disminución de la PAS ni de la PAD después de la administración de todas las dosis de cada andrógeno (Figura 11A, panel inferior). La FC (latidos  $\text{min}^{-1}$ ) disminuyó progresiva y significativamente al ir incrementando las dosis de TES y 5 $\beta$ -DHT, mientras que para 5 $\alpha$ -DHT sólo ocurrió en la última dosis. La FC no se modificó cuando se administró el volumen equivalente del vehículo (ETOH) en cada dosis (Figura 12). La administración de la dosis final de 5 $\beta$ -DHT (log 2.0  $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) produjo una marcada y significativa disminución en la PAM de animales SHR ( $> -70$  mmHg) y los valores basales de PA no se restablecieron hasta transcurridos más de 60 min. Este fuerte efecto antihipertensivo en respuesta a la dosis máxima de 5 $\beta$ -DHT también produjo la muerte en algunos animales (3 de 9 animales).



**Figura 11.** Efecto de los andrógenos sobre la presión arterial en ratas conscientes espontáneamente hipertensas (SHR) y en ratas normotensas (WKY). Los paneles superiores muestran los cambios dosis-dependientes en la presión arterial media (PAM) producidos por la administración de las dosis crecientes y acumulativas de los andrógenos en SHR y ratas WKY. El vehículo (etanol absoluto en el volumen equivalente de todas las dosis administradas) no modificó significativamente la PAM ( $p > 0.05$ ), pero los cambios producidos por cada andrógeno sobre la presión arterial (PA) sí fueron significativamente diferentes a los producidos por el vehículo (control) ( $p < 0.01$ ). Los paneles inferiores representan los cambios relativos de la PA sistólica (PAS) y PA diastólica (PAD) inducidos por cada andrógeno y expresados como porcentaje de disminución de la PA a partir de los valores basales hasta los valores registrados después del protocolo de administración. Valores significativamente diferentes \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , en comparación con 5 $\beta$ -DHT a la dosis más alta administrada. Los datos est n representados media  $\pm$  EEM,  $n = 6$  en cada grupo. Cuando las barras del EEM no aparecen en la figura, implica que el valor se encuentra dentro del símbolo.

### **1.2. Efecto hipotensor de los andrógenos en ratas normotensas Wistar-Kyoto**

Las ratas WKY como control de normotensión también mostraron respuestas hipotensoras provocadas por los andrógenos, pero este grupo fue mucho menos sensible que las ratas hipertensas (SHR) (Figura 11 y Tabla 1). Como se muestra en la Figura 11B, todos los andrógenos produjeron una disminución rápida de la PA y dependiente de la dosis ( $\sim 10$  min), del mismo modo que ocurrió en las SHR. En estos animales también fue  $5\beta$ -DHT el andrógeno que mostró la mayor potencia y eficacia en los animales normotensos (Tabla 1). Como en los animales SHR, la disminución de la PA inducida por los tres andrógenos fue rápida ( $\sim 10$  min) y parcialmente reversible, siendo el orden de potencia:  $5\beta$ -DHT > TES >  $5\alpha$ -DHT; y de eficacia:  $5\beta$ -DHT > TES =  $5\alpha$ -DHT (ver Tabla 1). Respecto a los cambios producidos en la PAS y PAD como consecuencia de la administración de cada andrógeno (Figura 11B, panel inferior), no se registraron cambios significativos a la última dosis administrada con respecto a los valores basales de PAS ni PAD. La FC no se modificó ni por TES ni por  $5\alpha$ -DHT, pero sí con  $5\beta$ -DHT solo a las dos dosis más altas utilizadas ( $\log 1.0$  y  $2.0 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) (Figura 12;  $p > 0.05$ ). 90 minutos después de administrar la última dosis de cada andrógeno, tanto la PA como la FC recuperaron completamente sus valores basales. El volumen equivalente que se administró en cada dosis (ETOH) no modificó significativamente la PA ( $p > 0.05$ ) (Figura 11B, panel superior) ni la FC (Figura 12).



**Figura 12.** Efecto de los andrógenos sobre la frecuencia cardíaca en ratas conscientes espontáneamente hipertensas (SHR) y en ratas normotensas (WKY). Obsérvase que la frecuencia cardíaca (FC; valores basales control, latidos  $\text{min}^{-1}$ ) no se modificó significativamente por la administración del volumen del vehículo equivalente a cada dosis de andrógeno ni en SHR o WKY. Los valores basales de la FC difieren significativamente \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , al compararlos con algunas dosis de los tres diferentes andrógenos (TES, 5 $\alpha$ -DHT y 5 $\beta$ -DHT). Las barras son la media de  $n = 6 \pm \text{EEM}$ .



**Tabla 1.** Disminución de la presión arterial dependiente de la administración de andrógenos, en ratas conscientes espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas normotensas (WKY).

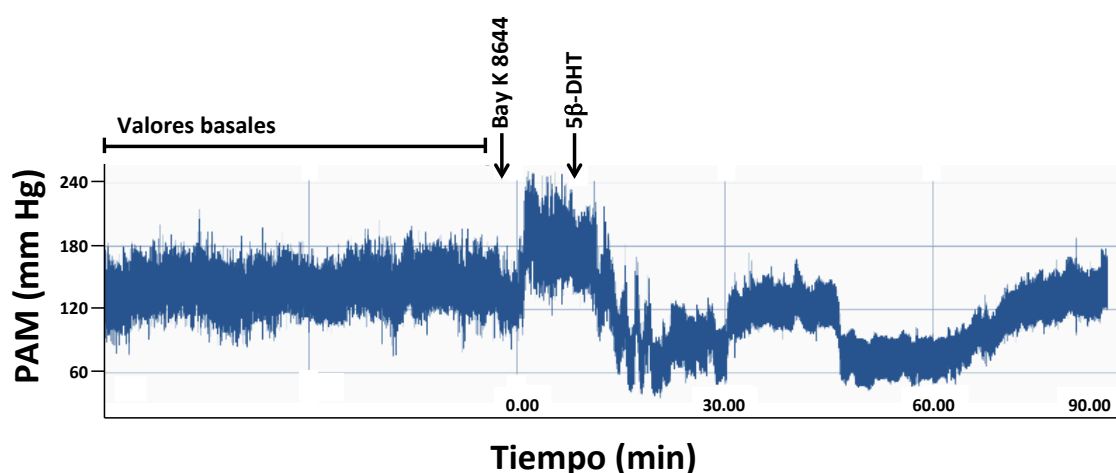
Andrógeno	DE <sub>50</sub> log $\mu\text{mol Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	E <sub>max</sub> ( $\Delta$ PAM mmHg)	Pendiente	r	Potencia
<b>SHR</b>					
TES	2.92 $\pm$ 0.15 <sup>##&amp;</sup>	- 41 $\pm$ 2.2	10.63	0.94	1.0
5 $\alpha$ -DHT	4.87 $\pm$ 0.14 <sup>†</sup>	- 32 $\pm$ 0.3	5.91	0.98	0.6
5 $\beta$ -DHT	1.39 $\pm$ 0.10	- 71 $\pm$ 2.4 <sup>*</sup>	19.45	0.86	2.1
<b>WKY</b>					
TES	6.94 $\pm$ 0.77 <sup>#</sup>	- 23 $\pm$ 1.8	5.86	0.98	1.0
5 $\alpha$ -DHT	7.97 $\pm$ 0.25 <sup>†</sup>	- 20 $\pm$ 0.3	5.19	0.96	0.9
5 $\beta$ -DHT	4.12 $\pm$ 0.17	- 34 $\pm$ 1.0 <sup>*</sup>	8.74	0.93	1.7

Los valores son la media ( $n = 6 \pm \text{EEM}$ ). DE<sub>50</sub> = valor de la dosis ( $\log \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) de andrógeno necesaria para inhibir el 50% de la presión arterial media (PAM). DE<sub>50</sub> fue calculada a partir de cada curva dosis-respuesta. La DE<sub>50</sub> de 5 $\beta$ -DHT fue significativamente diferente de: TES (<sup>#</sup> $p < 0.005$ , <sup>##</sup> $p < 0.001$ ), 5 $\alpha$ -DHT (<sup>†</sup> $p < 0.0001$ ); y TES vs. 5 $\alpha$ -DHT fue diferente en SHR (<sup>†</sup> $p < 0.001$ ), sin diferencia significativa respecto a WKY. E<sub>max</sub> = efecto máximo, cambio en la PAM (-mmHg) a la dosis más alta. La disminución en la PAM inducida por cada andrógeno fue significativamente diferente de los valores basales de la PA ( $p < 0.001$ ). 5 $\beta$ -DHT fue diferente en comparación con TES y 5 $\alpha$ -DHT (<sup>\*</sup> $p < 0.05$ ). TES vs. 5 $\alpha$ -DHT no fue diferente ni en SHR ni en WKY. El coeficiente de correlación de Pearson (r) representa el ajuste de la línea recta. La potencia fue calculada a partir de la DE<sub>50</sub> mediante la fórmula: DE<sub>50</sub> TES / DE<sub>50</sub> metabolito; asumiendo un valor de 1.0 para TES.

### 1.3. Efecto de 5 $\beta$ -DHT sobre el aumento de la presión arterial por activación de los CCDV-L inducida por Bay K8644

Este experimento estudió los efectos del andrógeno con mayor potencia antihipertensiva, 5 $\beta$ -DHT, sobre la respuesta presora inducida por la activación de CCDV-L en SHR conscientes. Para ello, se administró Bay K8644 (agonista dihidropiridínico de los CCDV-L) en bolo por vía i.v. observándose que los valores basales de la PAM ( $138 \pm 2.7$  mmHg) se elevaron significativamente ( $165 \pm 12$ ), siendo PAS / PAD =  $196 \pm 1.5$  mmHg /  $140 \pm 11$  mmHg. Sin embargo, se pudo observar una dramática disminución de la PA cuando 5 $\beta$ -DHT fue administrado en bolo i.v. ( $\log 2.0 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), inhibiendo rápida y completamente la respuesta presora a Bay K8644. La PAM continuó

disminuyendo hasta alcanzar niveles de hipotensión de alto riesgo ( $73 \pm 6.4$  mmHg);  $97 \pm 6.1$  /  $57 \pm 6.8$  mmHg. La aguda disminución de la PA terminó aproximadamente 15 min después de iniciada la administración de  $5\beta$ -DHT. Después de 90 minutos la PA recuperó parcialmente los valores basales. Es importante hacer notar que inmediatamente después de la administración del andrógeno se observó un esfuerzo del organismo por no dejar caer la PA, interpretado como una respuesta competitiva agonista-antagonista de la entrada de calcio. La figura 13 muestra un registro típico de la PA en una SHR consciente, donde se puede observar un aumento transitorio, pero marcado, en la PAM después de la administración de  $100 \text{ nmol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  de Bay K8644 y la respuesta antihipertensiva de  $5\beta$ -DHT, mostrando un intento por recuperar la PA después de la administración de  $5\beta$ -DHT, respuesta competitiva por el sitio dihidropiridínico del canal de calcio.

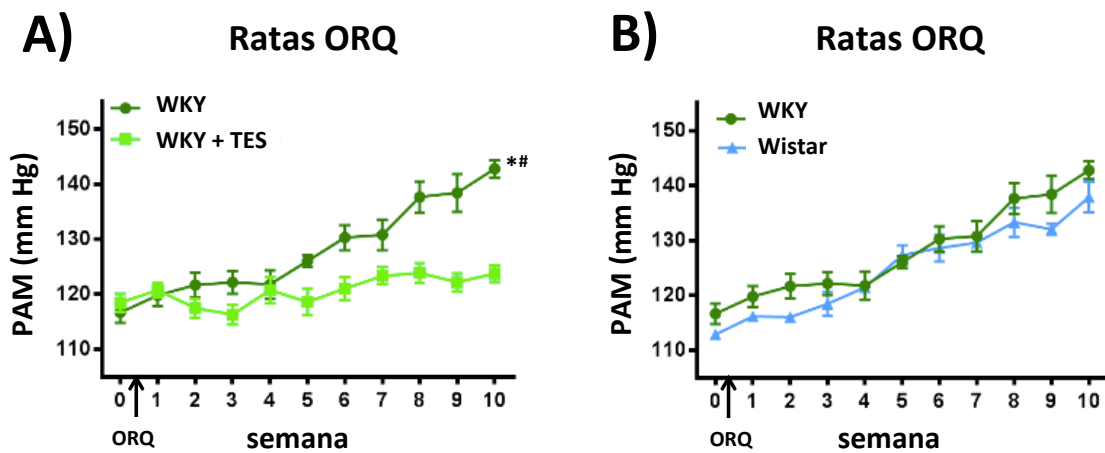


**Figura 13.** Respuesta presora y vasodepresora inducida por Bay K8644 y  $5\beta$ -DHT, respectivamente, en rata consciente espontáneamente hipertensa (SHR). Respuesta presora provocada por una sola dosis ( $100 \text{ nmol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) i.v en bolo de Bay K8644 (presión arterial media, PAM 180 mmHg), que fue inmediatamente suprimida por la administración de  $5\beta$ -DHT a  $\log 2.0 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , lo que produjo una caída dramática de la PAM a 69 mmHg. Nótese una respuesta competitiva después de la administración del andrógeno durante 15 min entre ambos compuestos, la recuperación de la PAM fue inestable y se inició después de 30 min. Las flechas indican el momento de administración i.v. de cada uno de los compuestos.

#### **1.4. Efecto de la orquidectomía sobre la presión arterial**

En las ratas normotensas WKY ( $116 \pm 1.2$  mmHg), la eliminación de los testículos resultó en un aumento progresivo, a través de 10 semanas, de la PAM hasta un máximo de  $142 \pm 1.6$  mmHg en la semana 10 (Figura 14A). La PAM de las ratas normotensas WKY antes de la orquidectomía ( $117 \pm 1.8$  mmHg) fue significativamente diferente a la PAM registrada a las 10 semanas después de la orquidectomía ( $142 \pm 1.6$  mmHg;  $p < 0.001$ ); dicho aumento fue significativo desde la semana 5 después de la orquidectomía en comparación con los valores iniciales de PAM. La Figura 14A también compara la PAM en ratas WKY orquidectomizadas (oWKY) que recibieron terapia de reemplazo androgénico con propionato de TES ( $8.75 \text{ mg kg}^{-1} \text{ semana}^{-1}$ ), mostrando que no hubo cambios significativos durante las 10 semanas posteriores a la orquidectomía ( $118 \pm 1.6$  frente a  $124 \pm 1.5$ ); lo que significa que el tratamiento con TES evitó el aumento en los valores de PA durante 10 semanas. Notoriamente, la PAM del grupo de ratas oWKY después de 10 semanas de tratamiento con terapia sustitutiva androgénica fue significativamente diferente a la PAM del grupo de ratas oWKY sin tratamiento con TES ( $124 \pm 1.5$  frente a  $147 \pm 1.6$  mmHg,  $p < 0.01$ ).

También se observó que la orquidectomía en ratas Wistar normotensas incrementó progresivamente la PAM de una manera similar al incremento observado en las ratas oWKY, y no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las dos cepas a las 10 semanas ( $134 \pm 3.9$  frente a  $142 \pm 1.6$  mmHg, respectivamente, Figura 14B). La PAM de algunas ratas Wistar ( $n = 8$ ) se registró más allá del período de 10 semanas y sus valores continuaron aumentando de la semana 10 a la semana 15 ( $134 \pm 3.9$  frente a  $145 \pm 1.2$  mmHg, respectivamente,  $p < 0.05$ , datos no mostrados).



**Figura 14.** Presión arterial media en ratas normotensas orquidectomizadas. La presión arterial media (PAM) se incrementó gradualmente después de la orquidectomía (ORQ) en ratas WKY normotensas (WKY), pero fue prevenida por la suplementación de testosterona (WKY + TES  $8.75 \text{ mg kg}^{-1} \text{ semana}^{-1}$ ) iniciada inmediatamente después de la ORQ (A). Diferencia estadística entre curvas  $*p < 0.01$ ; los valores de PAM son diferentes  $^{\#}p < 0.0001$  antes de la ORQ (semana 0) en comparación a la semana 10 después de la ORQ. No se encontró ninguna diferencia entre las curvas tiempo-dependiente en ratas WKY y ratas Wistar (B). La flecha indica el momento de la orquidectomía. Cada símbolo representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. Si las barras de error no aparecen en la figura, implica que el EEM se encuentra dentro del símbolo.

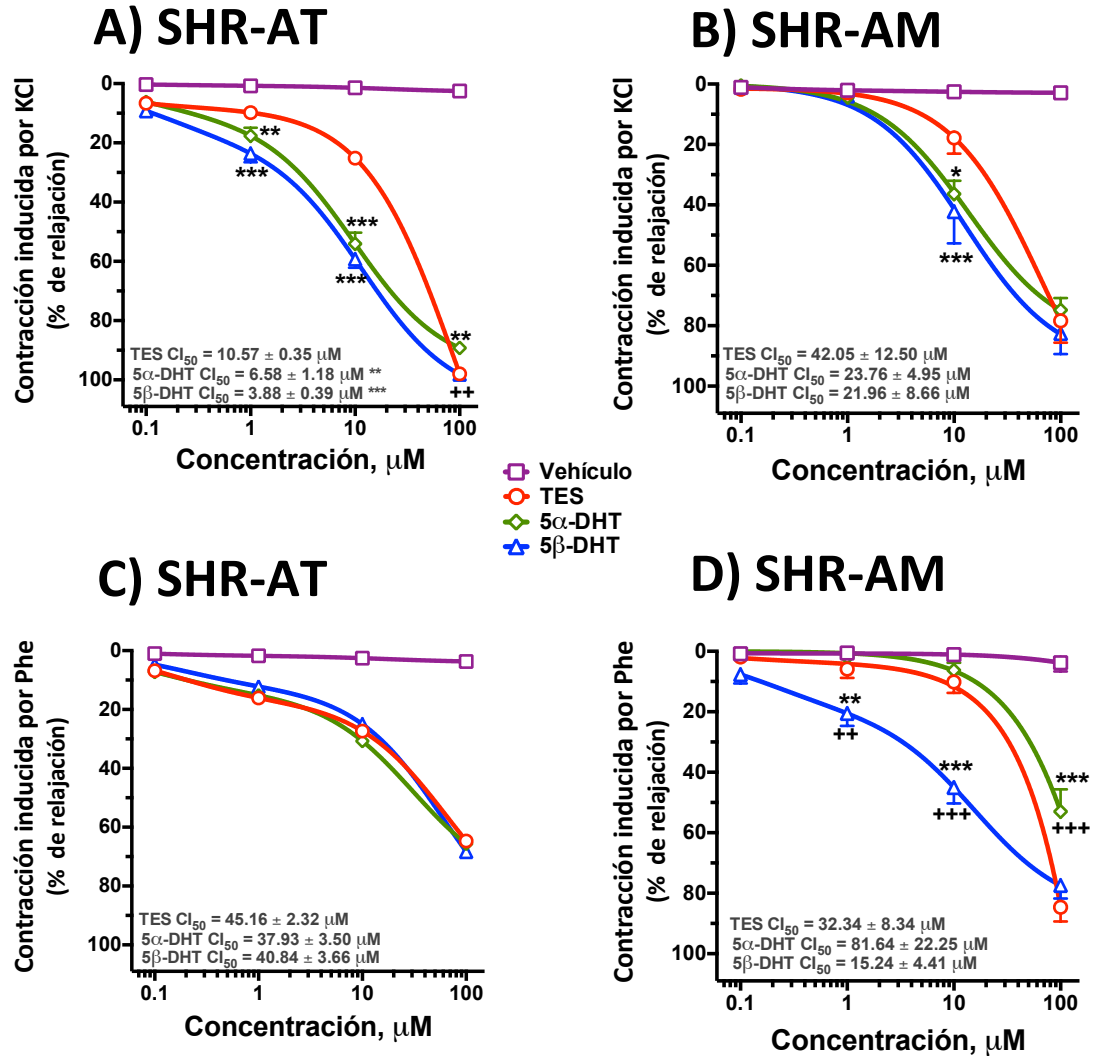
El vehículo en que se disolvió el propionato de TES (aceite de oliva virgen extra) fue administrado s.c. en el mismo volumen cada semana durante 10 semanas y, no alteró el aumento progresivo de la PA observado en las ratas castradas ( $p > 0.05$ ) (datos no mostrados).

## **2. Experimentos funcionales en tejido aislado**

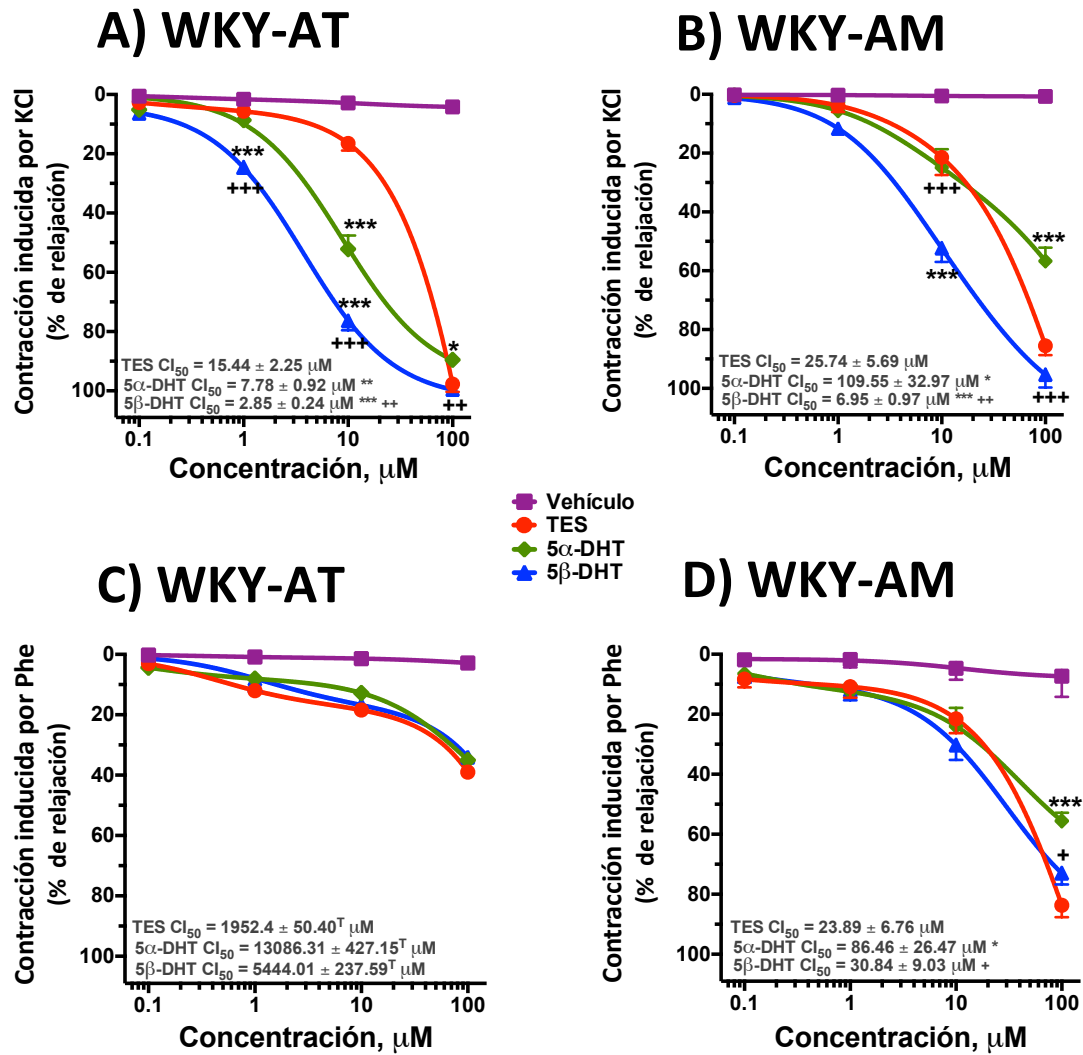
### ***2.1. Vasorelajación inducida por andrógenos en aorta torácica y arteria mesentérica precontraída con KCl o Phe***

La administración de cada andrógeno, TES y sus metabolitos 5-reducidos, a anillos de AT y AM precontraídos por KCl (60 mM) o Phe (1  $\mu$ M) en ratas hipertensas y normotensas produjo una relajación dependiente de la concentración, mientras que la adición del vehículo (ETOH) no modificó significativamente la contracción inducida por KCl o Phe (Figuras 15 y 16).

La curva concentración-respuesta a cada andrógeno fue significativamente diferente de la curva de ETOH ( $p < 0.01$ , Figuras 15 y 16). En ambos vasos sanguíneos, después de lavar el tejido y eliminar los andrógenos del baño de órganos, se observó una recuperación total del tono de la contracción inducida por KCl 60 mM; por lo que evidentemente los efectos vasorelajantes de los andrógenos son reversibles (datos no presentados).



**Figura 15.** Efecto vasorelajante inducido por andrógenos en vasos sanguíneos aislados de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Curvas concentración-respuesta vasodilatadora a TES,  $5\alpha$ - y  $5\beta$ -dihidrotestosterona (-DHT). A) y C) corresponden a anillos de aorta torácica (AT); B) y D) corresponden a anillos de arteria mesentérica (AM); precontraídos con KCl 60 mM en A) y B), o con fenilefrina (Phe) 1  $\mu\text{M}$  en C) y D). Cada símbolo representa la media  $\pm$  EEM ( $n \geq 6$ ). También se muestran los valores de concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ). Significancia estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  en comparación con TES; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  al comparar  $5\alpha\text{-DHT}$  vs.  $5\beta\text{-DHT}$ .



**Figura 16.** Efecto vasorelajante inducido por andrógenos en vasos sanguíneos aislados de ratas normotensas (WKY). Curvas concentración-respuesta vasodilatadora a TES,  $5\alpha$ - y  $5\beta$ -dihidrotestosterona (-DHT). A) y C) corresponden a anillos de aorta torácica (AT); B) y D) corresponden a anillos de arteria mesentérica (AM); precontraídos con KCl 60 mM en A) y B), o con fenilefrina (Phe) 1  $\mu\text{M}$  en C) y D). Cada símbolo representa la media  $\pm$  EEM ( $n \geq 6$ ). También se muestran los valores de concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ). Significancia estadística: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  en comparación con TES; +  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.001$  al comparar  $5\alpha\text{-DHT}$  vs.  $5\beta\text{-DHT}$ .

## 2.2. Comparación de la potencia vasorelajante de cada andrógeno

El análisis de las curvas concentración-respuesta (Figuras 15 y 16) mostró que la potencia vasorelajante para cada andrógeno era diferente y dependiente del agente contráctil usado. Los valores de  $CI_{50}$  se muestran en las curvas concentración-respuesta y la potencia relativa en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Valores de potencia y eficacia relativa de la vasorelajación inducida por andrógenos sobre la contracción inducida por KCl o Phe en aorta torácica (AT) y arteria mesentérica (AM) aisladas de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas normotensas (WKY).

Cepa-Vaso sanguíneo	Agente contráctil	Relación de potencia*			Relación de eficacia <sup>+</sup>		
		TES	5 $\alpha$ -DHT	5 $\beta$ -DHT	TES	5 $\alpha$ -DHT	5 $\beta$ -DHT
SHR-AT	KCl	1.00	1.60	2.72	1.00	0.91	1.00
	Phe	1.00	1.19	1.10	1.00	1.01	1.05
WKY-AT	KCl	1.00	1.98	5.43	1.00	0.91	1.01
	Phe	1.00	0.15	0.36	1.00	0.89	0.87
SHR-AM	KCl	1.00	1.76	1.91	1.00	0.95	1.05
	Phe	1.00	0.39	2.12	1.00	0.62	0.91
WKY-AM	KCl	1.00	0.23	3.70	1.00	0.66	1.11
	Phe	1.00	0.40	0.77	1.00	0.66	0.87

La relación de potencia se calculó a partir de la  $CI_{50}$  mediante la fórmula:  $CI_{50} \text{ TES} / CI_{50} \text{ metabolito}$  asumiendo un valor de 1.00 para TES. La relación de eficacia para cada vaso sanguíneo se calculó a partir de la  $E_{max}$  mediante la fórmula:  $E_{max} \text{ metabolito} / E_{max} \text{ TES}$  asumiendo un valor de 1.00 para TES.

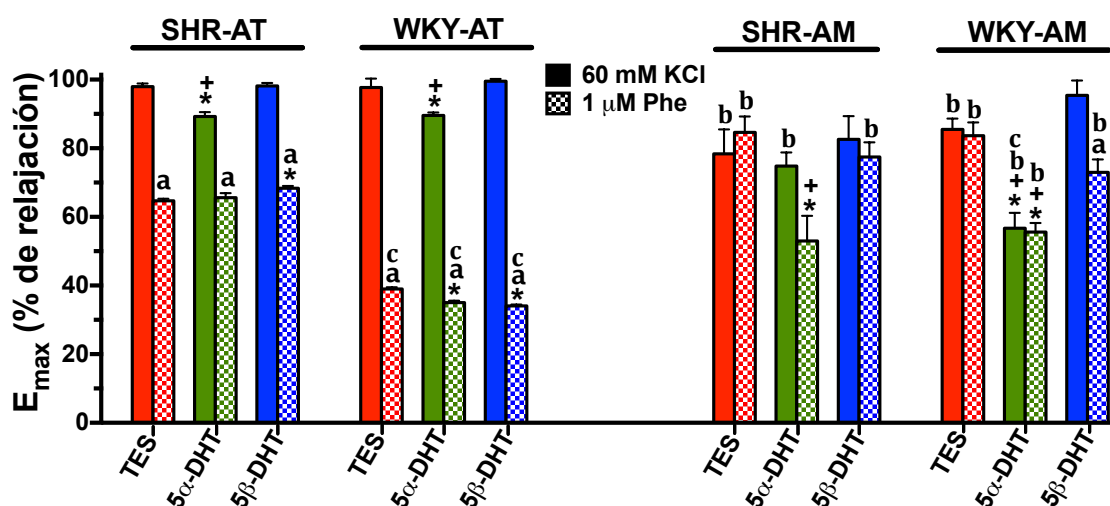
Se puede observar que las ratas WKY fueron menos sensibles que las SHR a la vasorelajación inducida por los andrógenos sobre anillos de AT precontraídos con Phe, lo que implica que el efecto vasorelajante de los



andrógenos fue significativamente mayor en ratas hipertensas que en ratas normotensas ( $p < 0.0001$ ). En general, los andrógenos fueron más potentes para provocar la relajación sobre la contracción inducida por KCl que en la contracción inducida por Phe en AT, pero no se encontraron diferencias en AM (Figura 15BD). Con respecto a SHR,  $5\beta$ -DHT resultó ser más potente y eficaz en AM precontraída con Phe (Figura 15D), pero no se encontraron diferencias en el caso de TES ni de  $5\alpha$ -DHT (Figura 15C). Es importante señalar que aunque los valores de  $CI_{50}$  para  $5\beta$ -DHT en AM de SHR precontraída con KCl o Phe no fueron estadísticamente diferentes, a las concentraciones de 1 y 10  $\mu$ M,  $5\beta$ -DHT sí mostró un mayor efecto vasorelajante en AM precontraída con Phe que con KCl (Figura 15BD).

### ***2.3. Comparación de la eficacia vasorelajante de cada andrógeno***

La Figura 17 muestra las diferencias en la sensibilidad de ambas contracciones al efecto relajante que induce cada andrógeno sobre AT y AM aislada de animales hipertensos y normotensos. En la AT aislada de SHR y WKY, precontraída con KCl, la eficacia relajante fue igual para TES y  $5\beta$ -DHT pero significativamente superior a  $5\alpha$ -DHT. Mientras que sobre la contracción de Phe se observó la misma relación de eficacia para los tres andrógenos, siendo la contracción inducida por KCl significativamente más sensible que Phe a la vasodilatación inducida por los andrógenos.



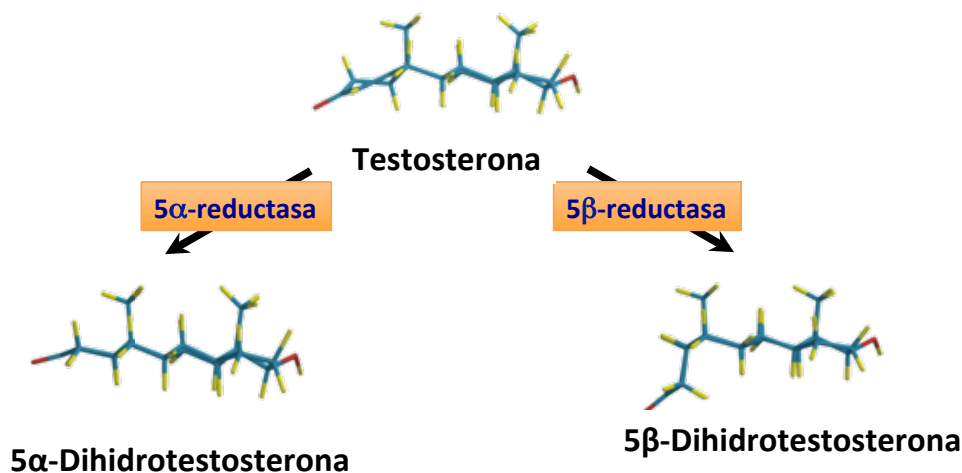
**Figura 17.** Efecto relajante máximo de los andrógenos en vasos sanguíneos aislados de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas normotensas (WKY). Efecto relajante máximo ( $E_{max}$  a 100  $\mu$ M) obtenido por cada andrógeno sobre anillos de aorta torácica (AT) o arteria mesentérica (AM) precontraídos por KCl o fenilefrina (Phe). Cada barra representa la media  $\pm$  EEM ( $n \geq 6$ ) de los valores de respuesta máxima ( $E_{max}$  a 100  $\mu$ M). Significancia estadística: \* $p < 0.05$  en comparación con TES; + $p < 0.05$  al comparar 5 $\alpha$ -DHT vs. 5 $\beta$ -DHT; <sup>a</sup> $p < 0.05$  en comparación con KCl; <sup>b</sup> $p < 0.05$  en comparación con AT; <sup>c</sup> $p < 0.05$  en comparación con SHR.

En AM de los SHR, los andrógenos presentaron una eficacia vasodilatadora similar con KCl o Phe, excepto 5 $\alpha$ -DHT que mostró menor eficacia sobre la contracción inducida con Phe. En AM de WKY, la TES y 5 $\beta$ -DHT mostraron una eficacia vasodilatadora similar en arterias precontraídas con KCl mientras que en arterias precontraídas con Phe el andrógeno 5 $\beta$ -DHT disminuyó su eficacia vasodilatadora. En esta cepa, la eficacia vasodilatadora de 5 $\alpha$ -DHT fue menor que la mostrada por TES o 5 $\beta$ -DHT.

Al comparar  $E_{max}$  entre las dos cepas, se observó que la contracción inducida por Phe sobre la AT de SHR, fue más sensible al efecto relajante de los tres andrógenos en SHR que en WKY. Al comparar la sensibilidad de los dos lechos vasculares al efecto vasodilatador de los tres andrógenos sobre

KCl, se observa que en animales hipertensos la AT es significativamente más sensible que la AM. Sin embargo, sobre la contracción de Phe, TES y 5 $\beta$ -DHT ejercieron un mayor  $E_{\max}$  en AM que en AT, al contrario que 5 $\alpha$ -DHT. En animales normotensos, la TES y 5 $\alpha$ -DHT sobre la contracción a KCl sí ejercieron un mayor efecto vasodilatador en AT que en AM; mientras que sobre la contracción de Phe, la AM fue más sensible al efecto vasodilatador de los tres andrógenos que la AT.

Es importante destacar que existen diferencias entre la conformación estructural de los andrógenos y sus efectos vasorelajantes, ya que la potencia y eficacia de cada andrógeno para inhibir los dos tipos de contracciones, con agentes de diferente naturaleza, fue dependiente de la conformación estructural de cada andrógeno; así, cuando el anillo A/B está en configuración *cis*, como ocurre en 5 $\beta$ -DHT (Figura 18), fue marcadamente más potente que TES y 5 $\alpha$ -DHT (Tabla 2).



**Figura 18.** Conformación tridimensional de la testosterona y sus dihidroderivados. Modificado de Perusquía y Stallone, 2010.

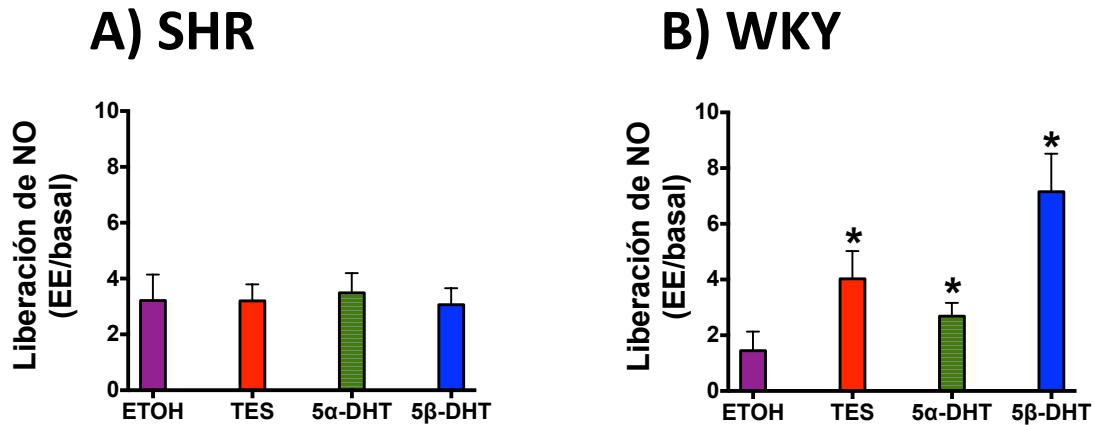
---

## **2.4. Efecto de los andrógenos sobre la función de las inervaciones nitrérgica, sensitiva y adrenérgica en arteria mesentérica:**

### **2.4.1. Liberación de los neurotransmisores NO, CGRP y NA**

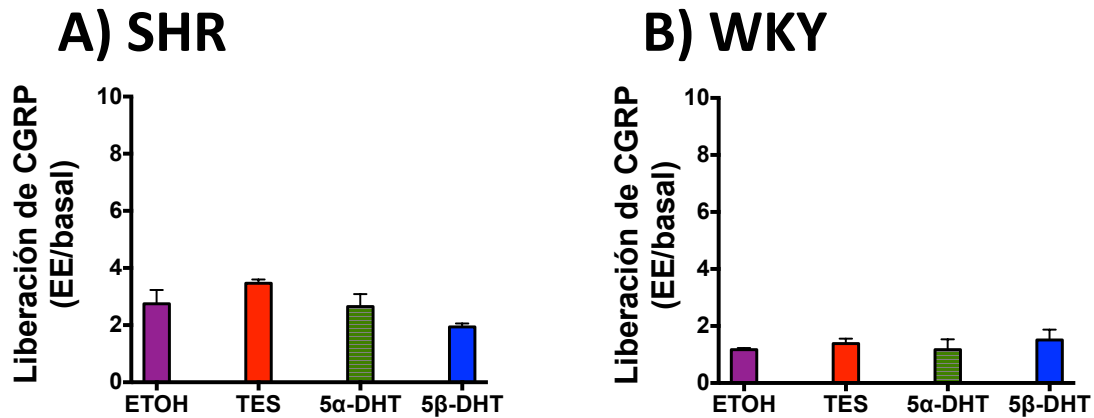
Para llevar a cabo estos experimentos, los anillos de AM se incubaron con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT durante 30 min previos a la aplicación de EE. Asimismo se evaluó en anillos arteriales independientes el efecto del vehículo (ETOH) sobre la respuesta inducida por EE.

En AM de SHR, la aplicación de EE (1-16 Hz) produjo un incremento en la liberación del NO en el grupo control, que no se vio modificada cuando el experimento se realizaba en presencia de ETOH (datos no mostrados). La incubación con TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT no modificó significativamente la liberación inducida por EE observada en ausencia de dichos andrógenos (Figura 19A). En AM procedentes de ratas WKY la liberación de NO en el grupo control (tanto en ausencia como en presencia de ETOH) fue significativamente menor que la observada en arterias de SHR ( $p < 0.01$ ) (Figura 19B). En arterias de ratas WKY la incubación con TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT incrementó significativamente la liberación de NO inducida por EE (Figura 19B).



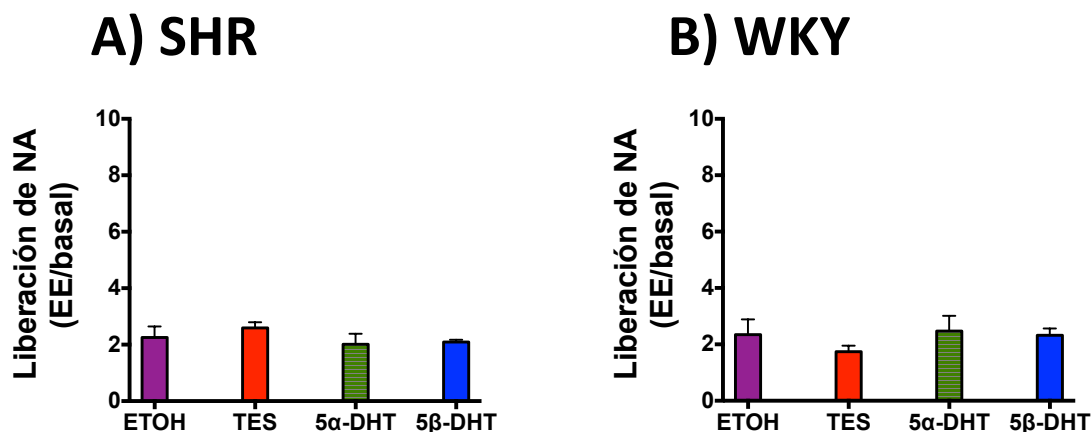
**Figura 19.** Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5α- o 5β-DHT en la liberación de NO inducida por estimulación eléctrica (EE) en segmentos de arteria mesentérica de (A) ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y (B) ratas normotensas (WKY). Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresaron como la relación entre la liberación de NO inducida por EE y la liberación basal. Significancia estadística: \* $p < 0.05$  respecto al vehículo (ETOH). Número de animales utilizados,  $n = 4 - 5$ .

Respecto a la liberación de CGRP (Figura 20), en anillos de AM procedentes de ratas SHR la incubación con TES, 5α- o 5β-DHT no modificó significativamente la liberación de CGRP inducida por EE observada en ausencia de dichos andrógenos (ETOH) (Figura 20A). En los anillos mesentéricos procedentes de ratas WKY (Figura 20B), la aplicación de EE produjo una liberación de CGRP menor que la observada en el grupo control de SHR ( $p < 0.05$ ). La incubación con cada uno de los andrógenos no modificó la liberación de CGRP respecto a la observada en presencia de ETOH.



**Figura 20.** Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5α- o 5β-DHT en la liberación de CGRP inducida por estimulación eléctrica (EE) en segmentos de arteria mesentérica de (A) ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y (B) ratas normotensas (WKY). Los resultados (media ± EEM) se expresaron como la relación entre la liberación de CGRP inducida por EE y la liberación basal. Número de animales utilizados, n = 5.

En referencia a la liberación de NA (Figura 21), en anillos de AM procedentes de SHR y de WKY la aplicación de EE incrementó de forma similar la liberación de NA ( $p > 0.05$ ). La exposición de los anillos de AM al vehículo (ETOH) no modificó significativamente la liberación del neurotransmisor inducida por EE (datos no mostrados). La incubación con cada uno de los andrógenos no modificó significativamente la liberación de NA inducida por EE en arterias de ratas SHR o WKY (Figura 21 A y B).



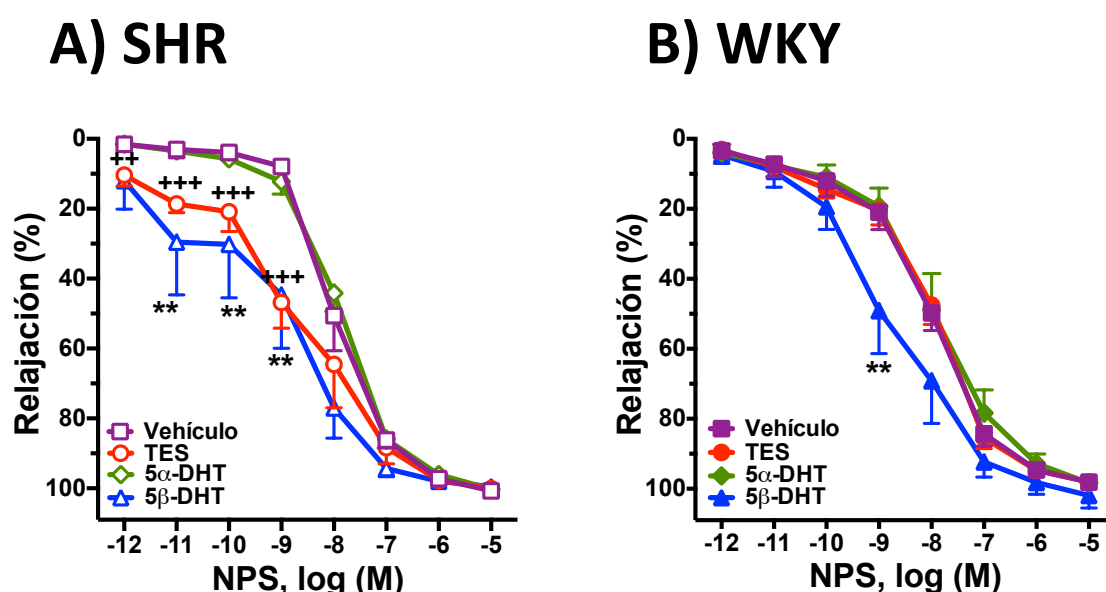
**Figura 21.** Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5α- o 5β-DHT en la liberación de NA inducida por estimulación eléctrica (EE) en segmentos de arteria mesentérica de (A) ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y (B) ratas normotensas (WKY). Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresaron como la relación entre la liberación de NA inducida por EE y la liberación basal. Número de animales utilizados,  $n = 5$ .

#### 2.4.2. Respuesta vasomotora de los neurotransmisores NO, CGRP y NA

De la misma forma descrita en el apartado anterior, los anillos de AM se incubaron con 10 nM de TES, 5α-DHT, 5β-DHT o con el vehículo (ETOH), y se procedió a la realización de las curvas concentración-respuesta a NO (utilizando como donante NPS), CGRP y NA.

En arterias precontraídas con NA, la aplicación de concentraciones crecientes y acumulativas de NPS indujo una respuesta vasodilatadora dependiente de la concentración (Figura 22) en todos los segmentos arteriales procedentes de SHR y WKY. En animales SHR, los segmentos arteriales incubados con 5β-DHT o con TES, mostraron una mayor respuesta vasodilatadora a NPS respecto al observado en los anillos incubados con el vehículo (Figura 22A), siendo estas diferencias más notables a bajas concentraciones de NPS (1 pM – 1 nM). Sin embargo, en los animales WKY solamente los anillos incubados con 5β-DHT, mostraron un incremento

significativo en el porcentaje de relajación en respuesta a 1 nM de NPS al compararlo con el producido en ausencia de andrógenos (Figura 22B). Los resultados mostraron que no existía una diferencia significativa entre la respuesta vasodilatadora de NPS en anillos de AM procedentes de SHR frente a WKY incubados con el vehículo ( $p > 0.05$ ).

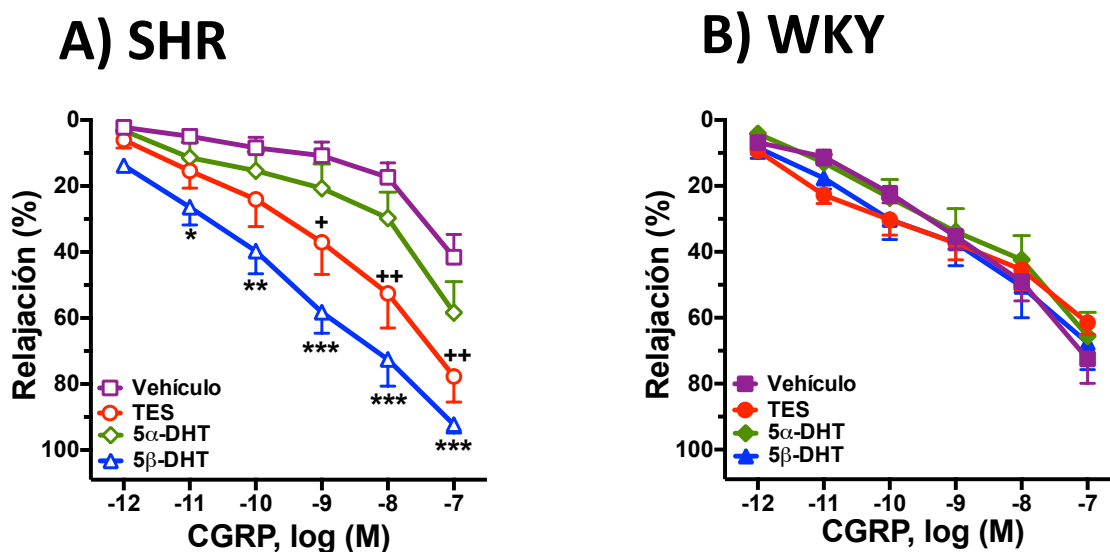


**Figura 22.** Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5α- o 5β-DHT sobre las curvas concentración-respuesta a nitroprusiato de sodio (NPS) en segmentos de arteria mesentérica de (A) ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y (B) ratas normotensas (WKY). Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresaron como porcentaje de inhibición de la contracción inducida por noradrenalina (1  $\mu$ M). Existen diferencias significativas entre el efecto de la incubación con TES o 5β-DHT vs. el vehículo (ETOH) sobre la misma concentración de NPS aplicada: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  entre TES vs. ETOH; \*\* $p < 0.01$  entre 5β-DHT vs. ETOH. Número de animales utilizados,  $n = 4 - 6$ .

Para analizar el efecto vasomotor del CGRP liberado, se realizaron curvas concentración-respuesta a este péptido. El CGRP produjo una

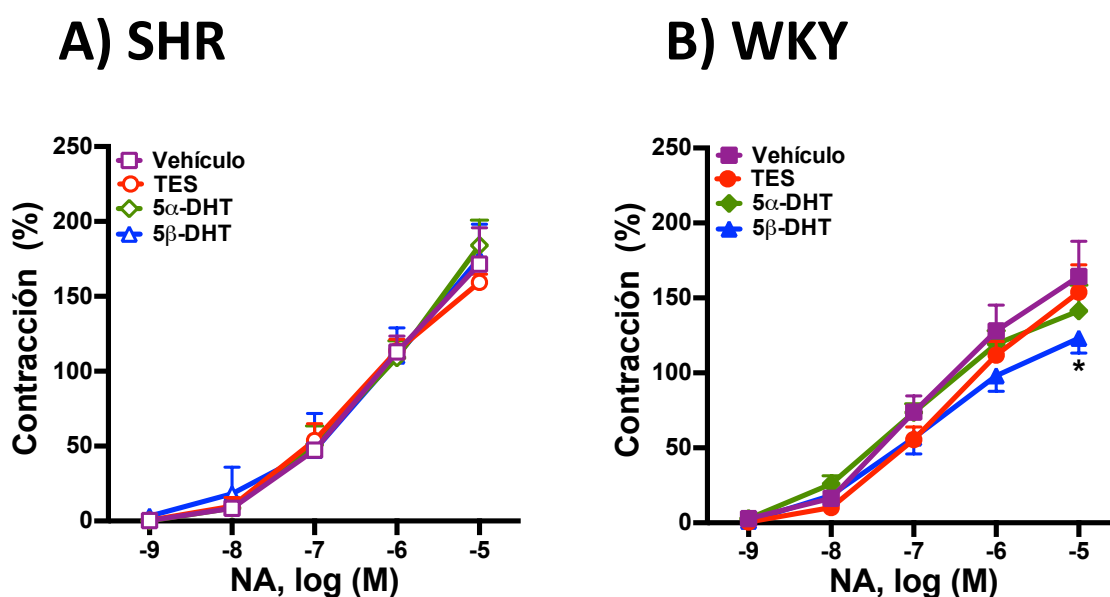


vasorelajación dependiente de la concentración en todos los anillos de AM procedentes de SHR y de WKY, como puede observarse en la Figura 23. En los segmentos arteriales procedentes de SHR incubados con TES o 5 $\beta$ -DHT se produjo un incremento significativo en el porcentaje de relajación inducido por CGRP en comparación con los anillos arteriales incubados con el vehículo (Figura 23A). Sin embargo, en los anillos mesentéricos procedentes de ratas WKY la incubación con cada uno de los andrógenos no modificó la vasorelajación inducida por CGRP respecto a la observada en presencia del vehículo (Figura 23B). La respuesta vasodilatadora inducida por CGRP en presencia del vehículo fue menor en anillos de AM de ratas SHR que en los procedentes de ratas WKY ( $p < 0.05$ ).



**Figura 23.** Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT sobre las curvas concentración-respuesta a CGRP en segmentos de arteria mesentérica de (A) ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y (B) ratas normotensas (WKY). Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresaron como porcentaje de inhibición de la contracción inducida por noradrenalina (1  $\mu$ M). Existen diferencias significativas entre la respuesta vasodilatadora inducida por CGRP obtenida en presencia de TES o de 5 $\beta$ -DHT vs. la obtenida en presencia del vehículo (ETOH): \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  entre TES vs. ETOH; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  entre 5 $\beta$ -DHT vs. ETOH. Número de animales utilizados,  $n = 4 - 6$ .

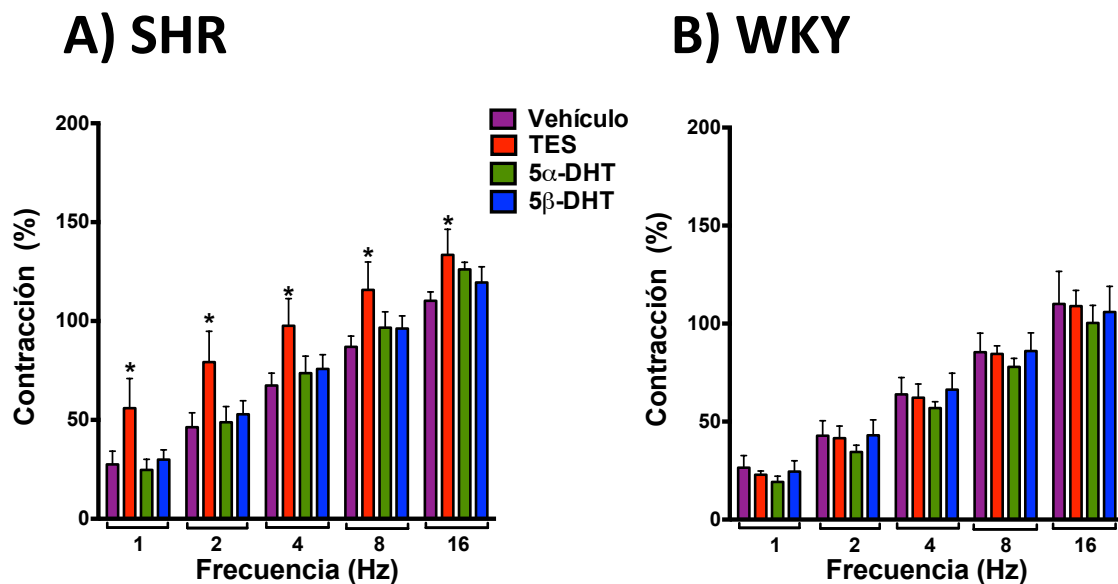
La realización de las curvas concentración-respuesta a NA (1 nM - 10  $\mu$ M) puso de manifiesto que la NA provocó una respuesta vasocontráctil dependiente de la concentración (Figura 24) en todos los anillos de AM procedentes de SHR y WKY. En animales SHR, los segmentos arteriales incubados con TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT no mostraron diferencias significativas en la respuesta contráctil inducida por NA en comparación con los anillos incubados con el vehículo (Figura 24A). Mientras que en los animales normotensos, los anillos arteriales incubados con 5 $\beta$ -DHT mostraron una disminución significativa en el efecto contráctil máximo inducido por NA en comparación con el obtenido en los anillos incubados con el vehículo (Figura 24B). Los resultados mostraron que no existía una diferencia significativa entre la respuesta vasoconstrictora de NA en anillos arteriales procedentes de SHR frente a WKY incubados con el vehículo ( $p > 0.05$ ).



**Figura 24.** Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT sobre las curvas concentración-respuesta a NA en segmentos de arteria mesentérica de (A) ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y (B) ratas normotensas (WKY). Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresaron como porcentaje de la contracción inducida por 60 mM KCl. Existen diferencias significativas entre la respuesta vasocontráctil inducida por NA obtenida en presencia de TES vs. la obtenida en presencia del vehículo (ETOH): \* $p < 0.05$  entre TES vs. ETOH. Número de animales utilizados,  $n = 4 - 6$ .

### 2.4.3. Respuesta inducida a EE

La aplicación de estímulos eléctricos (1-16 Hz) a anillos de AM procedentes de SHR y WKY produjo una respuesta vasocontráctil dependiente de la frecuencia aplicada que no se vio modificada por la incubación con ETOH (datos no mostrados). En anillos de AM de ratas SHR, la incubación con TES (10 nM) incrementó la respuesta contráctil inducida por EE, mientras que 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT no modificaron significativamente dicha respuesta (Figura 25A). En los anillos de AM de ratas WKY no se observaron diferencias significativas en la contracción inducida por EE entre los segmentos arteriales incubados con andrógeno vs. los segmentos incubados con el vehículo (Figura 25B). Los resultados mostraron que no existía diferencia significativa entre la respuesta vasoconstrictora inducida por EE en anillos arteriales procedentes de SHR frente a WKY incubados con el vehículo ( $p > 0.05$ ).



**Figura 25.** Efecto de la incubación con 10 nM de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT sobre la respuesta contráctil inducida por estimulación eléctrica (EE) en segmentos de arteria mesentérica de (A) ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y (B) ratas normotensas (WKY). Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresaron como porcentaje de contracción respecto a la contracción inducida por 60 mM KCl. Existe diferencia significativa \* $p < 0.05$  entre TES vs. vehículo (ETOH). Número de animales utilizados,  $n = 4$ .



## ***VII. DISCUSIÓN***



### **1. Efecto antihipertensivo de los andrógenos**

La administración i.v. de TES y sus metabolitos 5-reducidos, 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -DHT, produjeron una marcada disminución de la hipertensión en ratas SHR conscientes de 18-21 semanas mientras que en sus controles normotensos, las ratas WKY, se produjo una disminución menor de la PA. Estos hallazgos revelan que los andrógenos estudiados ejercen efectos antihipertensivos en animales hipertensos e hipotensivos en animales normotensos. Estos resultados muestran, por primera vez, un efecto antihipertensivo agudo de los andrógenos sobre la PA en un modelo animal de hipertensión *in vivo*. Los tres andrógenos estudiados produjeron disminuciones significativas en la PAS y la PAD, así como en la PAM y en la FC. Por lo tanto, estos resultados indican que los andrógenos pueden desempeñar un papel significativo en el control de la PA que puede ser atribuido a los efectos vasorelajantes agudos de los andrógenos observados en una variedad de vasos sanguíneos aislados de diferentes especies, incluido el humano, (revisado por: Yildiz y Seyrek, 2007; Perusquía y Stallone, 2010; Kelly y Jones, 2013; Perusquía, 2003), que parecen dar lugar a los efectos hipotensores sistémicos *in vivo*.

La elevada PA que se observa en la rata SHR consciente se redujo notablemente después de la administración i.v. de TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT, demostrando que los andrógenos, y en particular 5 $\beta$ -DHT, son capaces de ejercer efectos antihipertensivos agudos en este modelo de hipertensión. Además, observamos que en algunos animales estudiados (n = 3) de la cepa SHR, después de la dosis más alta de 5 $\beta$ -DHT (que presentó la mayor potencia antihipertensiva), la PA continuó disminuyendo hasta producir la muerte del animal, lo que puede representar una mayor sensibilidad de algunos animales a este andrógeno (estos resultados no fueron incluidos en el análisis de los datos). En los animales normotensos, la potencia (DE<sub>50</sub>) y la eficacia (E<sub>max</sub>) hipotensora de los andrógenos fueron notablemente menores a los valores obtenidos en los animales hipertensos, lo que indica que los andrógenos son capaces de disminuir valores de PA de normotensión (Perusquía *et al.*, 2015), pero en mucho menor grado que en SHR.

---

Esta diferencia en la eficacia y la potencia de los andrógenos para reducir la PA entre animales normotensos y animales hipertensos puede reflejar una estabilización más rápida de la PA en las ratas normotensas, lo que sugiere que las ratas WKY pueden presentar una mayor respuesta a mecanismos compensatorios de la PA cuando se provocan a los efectos hipotensores que ejercen los andrógenos en comparación con las respuestas antihipertensivas de los andrógenos en las SHR. Estos datos están de acuerdo con estudios recientes que han reportado efectos sistémicos de los andrógenos en ratas macho normotensas Sprague-Dawley (SD) y ratas Tfm (Perusquía *et al.*, 2015). En estos estudios, la TES indujo una reducción moderada en la PAM ( $\Delta$  16%), mientras que la misma dosis de  $5\beta$ -DHT indujo una mayor reducción en la PAM ( $\Delta$  23%) (Perusquía *et al.*, 2015). Los resultados presentados en esta tesis, en donde las respuestas a los andrógenos fueron mayores en SHR que en las ratas control WKY, confirma lo reportado por Honda *et al.* (Honda *et al.*, 1999) respecto a que la vasorelajación inducida por TES en la aorta aislada era mayor en SHR que en ratas WKY. En resumen, SHR parece ser más sensible a los efectos vasculares para reducir la PA por los andrógenos que la rata normotensa WKY. De hecho, los efectos antihipertensivos de los tres andrógenos en SHR causaron una disminución progresiva de la PA hasta alcanzar niveles de normotensión después de 30 min, que nunca regresaron a los valores basales de la PA. Por el contrario, en las ratas control normotensas WKY, la PA volvió a los valores basales normales después de 20-30 min. Esta diferencia en la respuesta vascular sistémica a los andrógenos en ratas WKY y SHR es de gran importancia respecto al potencial uso de estas hormonas en el tratamiento de la hipertensión.

Las dosis de los andrógenos utilizadas en este estudio son aparentemente altas en comparación con los niveles (plasmáticos) fisiológicos de TES en la rata macho; sin embargo, puesto que los andrógenos y otros esteroides pueden acumularse localmente a concentraciones mucho más altas en los tejidos blanco que en el plasma, probablemente, los niveles plasmáticos de los andrógenos endógenos que se han publicado no reflejen los verdaderos niveles de los andrógenos. Además, las dosis de andrógenos utilizadas en el presente estudio están en el mismo rango que las utilizadas en un estudio



reciente que reportó que administraciones i.v. de TES y 5 $\beta$ -DHT que provocaron reducciones dosis-dependiente en la PAM en ratas normotensas (Perusquía *et al.*, 2015).

Más importante aún es que los efectos directos antihipertensivos de los andrógenos en SHR observados en el presente estudio, apoyan la propuesta que los andrógenos endógenos puedan desempeñar un papel en el mantenimiento de la PA normal. De acuerdo con esta propuesta, existen numerosos estudios clínicos y epidemiológicos que han asociado niveles plasmáticos bajos de TES con disfunción cardiovascular. En concreto, los niveles de andrógenos plasmáticos son más bajos en hombres y mujeres hipertensos que en sus controles normotensos, además de presentar una correlación inversa con la PA (Barrett-Connor y Khaw, 1988; Khaw y Barrett-Connor, 1988; Hughes *et al.*, 1989; Phillips *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1997; English *et al.*, 1997; Svartberg *et al.*, 2004). Estos hallazgos clínicos sugieren que la hipotestosteronemia puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de la hipertensión. Por lo tanto, en esta Tesis, se realizaron experimentos para comprobar esta hipótesis. La castración de ratas macho es un modelo aceptado para el estudio de la deficiencia de andrógenos, y de hecho, los presentes resultados revelaron que la hipotestosteronemia inducida por la orquidectomía puede desempeñar un papel en el desarrollo de la hipertensión en ratas macho WKY y Wistar. La PAS, la PAD y la PAM aumentaron progresivamente en el período de diez semanas después de la castración de ratas normotensas WKY y Wistar, mientras que la terapia de reemplazo de TES en WKY previno esos aumentos en la PA. Estos hallazgos sugieren que los niveles bajos de TES y la terapia de reemplazo TES están asociados, respectivamente, con la hipertensión y el mantenimiento de la PA normal. De manera similar, hay evidencias que concuerdan con nuestros hallazgos, se ha reportado que la terapia de reemplazo de andrógenos redujo la PAD y mejoró el perfil lipídico en varones envejecidos que presentaban hipogonadismo (Mårin *et al.*, 1992).

Por el contrario, otros grupos de investigación han reportado hallazgos contradictorios a los del presente estudio. Así, se ha descrito que la castración

---

disminuye la PA en SHR (Iams y Wexler, 1977; Ganten *et al.*, 1989; Chen y Meng, 1991; Reckelhoff *et al.*, 1998, 2000), que la terapia de reemplazo de TES con un esteroide anabólico-androgénico aumenta la PAM en ratas macho Wistar (Bissoli *et al.*, 2009), y que la castración de ratas Wistar no altera la PAS, mientras que el tratamiento con TES incrementa la PA (Rouver *et al.*, 2015). Una posible explicación a estos hallazgos contradictorios podría atribuirse a las diferencias entre las cepas utilizadas. Sin embargo, nuestros resultados lo descartan, dado que la castración aumenta la PA en ratas normotensas WKY y Wistar, excluyendo aparentemente esta posibilidad. No obstante, se ha descrito que en ratas SD orquitectomizadas en edad prepúber no desarrollan hipertensión hasta llegar al envejecimiento (del Campo *et al.*, 2014). Por lo tanto, otras diferencias en las condiciones experimentales como la edad del animal, la forma y el tipo de reemplazo androgénico, el régimen de dosificación y los efectos tiempo-dependientes de la castración podrían explicar estos resultados contradictorios que se han publicado respecto a los andrógenos sobre la PA. Contradicciones similares también se han obtenido en un estudio muy reciente (Oloyo *et al.*, 2016), en el que se ha reportado que la hipertensión inducida por una dieta alta en sal en ratas SD se revirtió por la orquitectomía, mientras que el reemplazo de TES previno dicha reversión. Sin embargo, una vez más, las diferencias en los métodos experimentales pueden ser los responsables de estas diferencias, en ese trabajo se utilizaron ratas anestesiadas con ventilación espontánea, en comparación con las ratas conscientes utilizadas en el presente estudio, y para el reemplazo de TES se administró i.m. una combinación de cuatro compuestos de TES (Sustanon 250) una vez cada tres semanas.

Un hecho contundente es que la TES en los machos no puede ser nociva, de lo contrario todos los machos en edad reproductiva serían hipertensos y los machos viejos serían normotensos, siendo esto un absurdo. En apoyo a nuestras evidencias experimentales descritas en el presente trabajo, la disminución de los niveles plasmáticos de TES asociada al envejecimiento se correlaciona con otras enfermedades características de esta etapa vital, tales como la hipertensión, obesidad, síndrome metabólico, osteoporosis, hipogonadismo, incontinencia urinaria, pérdida de fuerza

muscular y deterioro del estado de ánimo con disfunción sexual asociada, incluyendo disfunción eréctil, eyaculación precoz y disminución de la libido. Es importante comentar que la terapia de reemplazo de TES reduce la gravedad de estas enfermedades asociadas con el envejecimiento (para revisiones ver Traish *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Isidori *et al.*, 2014; Corona *et al.*, 2014; Pongkan *et al.*, 2016).

#### Mecanismo de acción del efecto antihipertensivo de los andrógenos

La rápida caída (~ 10 min) inducida por los andrógenos y la posterior recuperación de la PA tanto en ratas hipertensas como normotensas descrita en el presente estudio demuestra que los efectos antihipertensivos, parecen un mecanismo de acción directo, no mediado genómicamente. Esta propuesta está fuertemente apoyada no sólo por la rapidez de sus efectos, tanto *in vivo* e *in vitro*, sino porque también se producen en ratas Tfm (son animales carentes del receptor intracelular funcional a andrógenos) (Perusquía *et al.*, 2015).

Para determinar el mecanismo nongenómico del potente efecto antihipertensivo de 5 $\beta$ -DHT, se analizó, por primera vez *in vivo*, la capacidad de este andrógeno para abolir la respuesta presora inducida por un agonista de CCDV-L. Como se esperaba, 5 $\beta$ -DHT inhibió rápidamente la respuesta presora a Bay K8644 y redujo notablemente la PA hasta llegar a la hipotensión (PAM  $\Delta$  73  $\pm$  6.4 mmHg). La rápida supresión de la respuesta presora por 5 $\beta$ -DHT, sugiere que este andrógeno bloquea la entrada de Ca<sup>2+</sup> por inactivación de los CCDV-L activados por Bay K8644. Este es el primer estudio *in vivo* que revela que el efecto agudo antihipertensivo de 5 $\beta$ -DHT, y quizás de otros andrógenos en SHR, es principalmente debido a un bloqueo de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los CCDV-L *in vivo*. Es importante resaltar que la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los CCDV-L es uno de los principales mecanismos para el mantenimiento de la PA (Behuliak *et al.*, 2013) y tal vez no es sorprendente que 5 $\beta$ -DHT pueda abolir la respuesta presora a Bay K8644 por bloquear los CCDV-L, probablemente por unirse al sitio dihidropiridínico del canal de Ca<sup>2+</sup>. De acuerdo con este razonamiento, estudios electrofisiológicos realizados en miocitos vasculares aislados, utilizando la técnica de patch-clamp, han

---

demostrado que TES y sus dihidrometabolitos a concentraciones fisiológicas en la rata macho inhiben las corrientes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV-L (Scragg *et al.*, 2004, 2007; Hall *et al.*, 2006; Montaña *et al.*, 2008; Perusquía y Stallone, 2010). Estos estudios también revelaron que TES comparte el mismo sitio de unión de las dihidropiridinas; denominado, subunidad  $\alpha_{1C}$  de CCDV-L, para provocar el bloqueo directo del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Scragg *et al.*, 2007); además, TES fue más potente que la nifedipina, antagonista de los CCDV-L para bloquear las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales en cultivos primarios de miocitos vasculares (Montaña *et al.*, 2008).

Es cierto que el mecanismo de vasorelajación inducido por TES también se ha asociado con la activación de los canales de  $\text{K}^+$  del músculo liso vascular (revisado por Perusquía y Stallone, 2010) en particular, los canales de  $\text{K}^+$  operados por voltaje ( $\text{K}_v$ ) y/o los canales de  $\text{K}^+$  de alta conductancia activados por calcio ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ). Esta diferencia en el mecanismo de la vasorelajación inducida por andrógenos parece ser tanto dependiente de la concentración como del lecho vascular. De hecho, estudios recientes en ratas macho conscientes con la transmisión ganglionar bloqueada revelan que los efectos hipotensores sistémicos de los andrógenos son probablemente debido a una acción vasodilatadora sistémica, que parece ser dependiente de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Perusquía *et al.*, 2015), un mecanismo que es coherente con los efectos vasorelajantes dependientes de los canales de  $\text{K}^+$  observados en microvasos aislados (Perusquía y Stallone, 2010). Por consiguiente, a continuación serán discutidos tanto el efecto vasodilatador de los andrógenos como el efecto sobre la liberación y función de distintos neurotransmisores.

## **2. Efecto vasodilatador de los andrógenos**

En este estudio, encontramos que los tres andrógenos probados provocaron una vasorelajación inmediata en ambos vasos sanguíneos, de conductancia y de resistencia. Numerosos estudios han demostrado que la vasorelajación provocada por los andrógenos es una acción no genómica que no está mediada por el receptor clásico de andrógenos intracelular ni la transcripción de genes (Yue *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2002; Perusquía, 2003; Perusquía y Stallone, 2010). Esta característica fue sustentada en el presente estudio por el hecho de que los andrógenos indujeron una vasorelajación rápida (~ 2 min) y la relajación desapareció después de que el andrógeno fue retirado del tejido.

Los tres andrógenos TES, 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -DHT indujeron una vasodilatación más fuerte en SHR (ratas hipertensas) que en WKY (ratas normotensas), este resultado está de acuerdo con estudios previos (Honda *et al.*, 1999), los cuales reportaron que la vasorelajación inducida por TES en aorta aislada era mayor en las SHR que en las ratas WKY. Además, con excepción de 5 $\beta$ -DHT sobre la contracción inducida por Phe en AM de SHR, no se ha encontrado diferencia en la potencia relajante de los tres andrógenos sobre la contracción de Phe en AT y AM ( $p > 0.05$ ). Este resultado puede explicar la marcada respuesta antihipertensiva de 5 $\beta$ -DHT descrita previamente. Del mismo modo, sólo la AM precontraída por Phe resultó más sensible a la vasorelajación inducida por los andrógenos que la AT en SHR y WKY. Por lo tanto, es tentador sugerir que el presente estudio aporta nuevas pruebas de que 5 $\beta$ -DHT, y en menor medida TES y 5 $\alpha$ -DHT, provocan una respuesta antihipertensiva actuando directa y fuertemente en el lecho vascular de resistencia.

Estudios previos han reportado que TES relaja algunos vasos sanguíneos de resistencia, tales como el mesentérico, prostático, pulmonar, subcutáneo (Jones *et al.*, 2002; Malkin *et al.*, 2006a; Navarro-Dorado *et al.*, 2008; Rowell *et al.*, 2009) y el lecho arterial mesentérico (Tep-areenan *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta donde sabemos, este es el primer estudio en el que se analiza el efecto vasodilatador de TES, 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -DHT en un lecho mesentérico haciendo la comparación con un lecho de conductancia, teniendo

---

además en cuenta las posibles diferencias en el efecto vasodilatador en función del agente contráctil utilizado.

#### Mecanismo de acción de los efectos vasorelajantes de los andrógenos

Los andrógenos fueron capaces de inducir vasorelajación tanto sobre la contracción inducida por KCl como por Phe. Basándonos en estos hallazgos, es importante tener en cuenta que estos dos vasoconstrictores son agentes de diferente naturaleza, es decir, la respuesta contráctil inducida por cada uno de ellos depende de diferentes mecanismos de contracción; por ejemplo, entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular frente a liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A este respecto, es bien sabido que la despolarización de la membrana mediante una solución de KCl alto estimula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular, principalmente a través de CCDV-L, para inducir una contracción sostenida del músculo liso; mientras que la respuesta contráctil generada por Phe estimula tanto la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular (Otani *et al.*, 1988; Khalil y van Breemen, 1988; Bhugra y Gulati, 1996; De Witt *et al.*, 2001; Damron *et al.*, 2002). De hecho, se ha demostrado que uno de los mecanismos de la contracción tónica con Phe después de la activación del receptor adrenérgico  $\alpha_1$  está mediado por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV-L sensibles a nifedipina (Nishimura *et al.*, 1991). Con respecto a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como consecuencia de una vasoconstricción inducida por agonistas, como la Phe, se sabe que activa la fosfolipasa C, una enzima que a su vez actúa promoviendo la ruptura del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato en  $\text{IP}_3$  y 1,2-diacilglicerol (Berridge e Irvine, 1984). El  $\text{IP}_3$  estimula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de organelos intracelulares como el retículo sarcoplásmico y provoca un aumento transitorio en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Suematsu *et al.*, 1984), mientras que el 1,2-diacilglicerol activa la PKC (Nishizuka, 1992).

Respecto al agente contráctil utilizado, nuestros resultados indican que los tres andrógenos fueron más potentes para relajar la contracción inducida por KCl que por Phe en AT de ratas SHR y WKY, lo que sugiere un bloqueo preferencial de los CCDV-L en los vasos sanguíneos de conductancia. Además, la capacidad de los andrógenos para inducir vasorelajación en la

contracción inducida por Phe también confirma un bloqueo del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV-L sensibles a nifedipina, además de inhibir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Sin embargo, la potencia vasodilatadora de los andrógenos sobre la contracción de Phe reveló varias diferencias: (i) en SHR, la potencia más alta de  $5\beta$ -DHT se observó en AM mientras que la potencia más alta de  $5\alpha$ -DHT se observó en AT; (ii) en ratas normotensas (WKY), TES y  $5\beta$ -DHT eran más potentes en AM que en AT, siendo el efecto de los tres andrógenos en AT prácticamente inapreciable. Estos resultados sugieren que  $5\beta$ -DHT está actuando bloqueando tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular como la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, aunque el efecto de  $5\beta$ -DHT en esta última parece ser de gran relevancia en la hipertensión, como lo indica el aumento de la potencia relativa en AM de SHR precontraída con Phe (2.12 veces más potente que TES) comparado con lo obtenido en WKY (0.77 veces menos potente que TES). Además, debe observarse que  $5\beta$ -DHT a 1 y 10  $\mu\text{M}$  mostró un mayor efecto vasorelajante en la AM de SHR precontraída con Phe comparado con las arterias precontraídas con KCl. Estas diferencias demuestran la capacidad de  $5\beta$ -DHT para relajar la AM precontraída en respuesta a la vasoconstricción simpática, especialmente cuando existe hipertensión contribuyendo al marcado efecto antihipertensivo. La interpretación de estos resultados es que los tres andrógenos deben tener diferente preferencia por los sitios de acción. Con respecto a la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por los andrógenos, los resultados mostrados están de acuerdo con estudios experimentales previos realizados en células del músculo liso, donde diferentes andrógenos son capaces de: (i) disminuir el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por KCl, e; (ii) inactivar los CCDV-L (Perusquía *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2006; Scragg *et al.*, 2004, 2007; Montañó *et al.*, 2008; Flores-Soto *et al.*, 2017).

Se puede concluir que el mecanismo de la acción vasorelajante de los diferentes andrógenos no es totalmente similar y pueden estar implicados mecanismos adicionales en sus efectos vasculares. La regulación de la PA por andrógenos puede involucrar la activación de múltiples vías de señalización más allá de la activación de receptores adrenérgicos  $\alpha$ , la inhibición de CCDV-L y otros canales no dependientes de voltaje. A este respecto, también es importante considerar que en el lecho arterial mesentérico, la vasoconstricción

---

simpática juega un papel crucial en el mantenimiento de la resistencia periférica mediante la liberación de diferentes neurotransmisores (Hirst y Edwards, 1989). De hecho, no se puede descartar que los efectos vasorelajantes de los andrógenos también puedan reflejar cambios en la liberación de neurotransmisores, similarmente a la descrita para mediadores celulares no neurogénicos (por ejemplo, tromboxano, prostaciclina y prostaglandina E<sub>2</sub>) (Blanco-Rivero *et al.*, 2006c; Martorell *et al.*, 2008; del Campo *et al.*, 2014). Por este motivo, se realizaron estudios sobre el efecto de los andrógenos sobre la función de las inervaciones adrenérgica, nitrérgica y sensitiva.

### ***3. Efecto de los andrógenos sobre la función de la inervación nitrérgica, sensitiva y adrenérgica en arteria mesentérica***

Los resultados obtenidos mostraron que los andrógenos fueron capaces de inducir modificación en la liberación y/o efecto vasomotor de los neurotransmisores analizados, siendo esta regulación dependiente tanto del andrógeno utilizado como de la condición experimental del animal (hipertenso vs. normotenso). A continuación se discutirá detalladamente el efecto de los andrógenos sobre la liberación y función vasomotora de los neurotransmisores NO, CGRP y NA, así como el efecto sobre la respuesta vasocontráctil inducida por EE.

#### **Efectos de los andrógenos sobre la liberación de los neurotransmisores NO, CGRP y NA**

La aplicación de estímulos eléctricos a anillos de AM produjo un incremento en la liberación de NO que fue significativamente mayor en arterias procedentes de SHR que en los procedentes de WKY. Estos resultados están de acuerdo con estudios experimentales previos en los que L-NAME, inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), incrementó la respuesta vasoconstrictora inducida por EE en segmentos arteriales de SHR, mientras que no modificaba dicha contracción en anillos mesentéricos procedentes de ratas WKY, lo que



indicaba la participación del NO neuronal sólo en segmentos arteriales de SHR (Ferrer *et al.*, 2004a, 2004b).

Es bien conocido que la PKC es capaz de modular la actividad de la NOS, habiéndose descrito tanto incremento (Ohara *et al.*, 1995; Riccio *et al.*, 1996) como disminución (Nakane *et al.*, 1991; Bredt *et al.*, 1992; Hirata *et al.*, 1995) de la actividad de dicha enzima. Por otra parte, resultados previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que la actividad de la PKC está ya incrementada en hipertensión, siendo la responsable del incremento en la producción del NO neuronal en arterias de ratas SHR respecto a arterias de ratas WKY (Marín *et al.*, 2000). Por tanto, nuestros resultados están de acuerdo con lo sugerido previamente acerca de que el incremento en la liberación de NO neuronal puede reflejar un mecanismo compensatorio al aumento de las resistencias vasculares observadas en hipertensión (Marín *et al.*, 2000).

Respecto al efecto de los andrógenos sobre la liberación de NO, los resultados mostraron que la incubación de AM procedentes de ratas SHR con TES, 5 $\alpha$ -DHT o 5 $\beta$ -DHT no modificó la liberación de NO inducida por EE observada en ausencia de andrógenos. Sin embargo, en AM de ratas WKY, la incubación con cada uno de los tres andrógenos incrementó de forma significativa la liberación de NO inducida por EE. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual los andrógenos aumentan la liberación de NO en WKY no parece ser funcional en arterias de SHR. En este sentido, se ha descrito que TES y 5 $\alpha$ -DHT activan PKC (Hatanaka *et al.*, 2015) y nuestro grupo de investigación ha reportado que la PKC regula positivamente la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Blanco-Rivero *et al.*, 2007) y nNOS (Ferrer *et al.*, 2000a; Blanco-Rivero *et al.*, 2005). El hecho de no observar modificaciones en la liberación de NO en arterias de ratas SHR tras la incubación con cada uno de los andrógenos, podría deberse a que en hipertensión la PKC ya está activada, y por tanto los andrógenos no conseguirían producir una mayor activación, tal y como se ha observado en presencia del activador de la PKC forbol dibutirato (Marín *et al.*, 2000). Adicionalmente, el incremento en la liberación de NO neuronal producido por los andrógenos en arterias de ratas normotensas, en especial por 5 $\beta$ -DHT, está de acuerdo con el estudio

---

realizado por Perusquía *et al* (2015) en el que se describe la participación del NO neuronal, mediante activación de nNOS, en el efecto hipotensor inducido por TES aplicable también a otros andrógenos como 5 $\beta$ -DHT. Por tanto, el incremento observado en la liberación de NO neuronal inducida por EE en arterias de ratas WKY podría contribuir al efecto hipotensor observado en ratas WKY tras la administración i.v. de cada uno de los andrógenos (Perusquía *et al.*, 2017), mientras que en el efecto antihipertensivo observado en SHR participarían otros mecanismos.

Respecto a la liberación de CGRP, la aplicación de EE incrementó significativamente la liberación de este neuropéptido en AM de ratas SHR, (Figura 20A), lo que está de acuerdo con diversos estudios previos que demuestran que la terminación nerviosa sensitiva libera CGRP en respuesta a EE (Kawasaki *et al.*, 1988; Gangula *et al.*, 2000; Blanco-Rivero *et al.*, 2013). Sin embargo, en arterias de ratas WKY, los resultados obtenidos mostraron que la EE no indujo un incremento significativo en la liberación de CGRP (Figura 20B), lo que estaría de acuerdo con un estudio previo realizado en ratas normotensas Wistar en el que se describe una ligera liberación de CGRP en respuesta a EE (Sastre *et al.*, 2016). Adicionalmente, estos resultados claramente indican que la liberación de CGRP es mayor en arterias de ratas SHR que de WKY. A este respecto existen estudios que defienden que bajo condiciones fisiológicas el CGRP liberado desde la inervación sensitiva no parece jugar un papel importante en la regulación del tono vascular, mientras que en condiciones patológicas posee una función protectora en el sistema cardiovascular (González-Hernández *et al.*, 2016). Así, se ha descrito un incremento en la liberación de CGRP en aorta (Tang *et al.*, 1989), arterias coronarias (Lechleitner *et al.*, 1992) y mesentéricas (Sastre *et al.*, 2016) procedentes de distintos modelos animales que presentan patologías cardiovasculares. Asimismo, existen estudios que han reportado que la hipertensión reduce la liberación de CGRP en neuronas de los ganglios dorsales de la médula espinal (Chen *et al.*, 2008) así como la concentración plasmática de CGRP (Xu *et al.*, 1989). Sobre estas discrepancias se ha sugerido que la acción del CGRP puede depender del modelo de hipertensión estudiado (Márquez-Rodas *et al.*, 2006).

Más allá de estas consideraciones, los resultados mostrados en este estudio reflejan claras diferencias en la liberación de CGRP en AM de ratas SHR comparadas con WKY que pueden estar relacionadas con la participación de otros componentes alterados en hipertensión. Así, se ha descrito que la liberación de CGRP en neuronas de ganglios de la raíz dorsal de ratas SHR estaba disminuida con respecto a neuronas aisladas de ratas WKY, debido a la disminución de los niveles de NO (Chen *et al.*, 2008). Este resultado apoyaría la menor liberación de CGRP en ratas WKY, observada en nuestro estudio, correlacionada a su vez con una menor liberación de NO neuronal. Por otra parte, se ha descrito que la activación de receptores de potencial transitorio vallinoide 1 (TRPV1) (Eguchi *et al.*, 2004) y la activación de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Kawasaki *et al.*, 1990) es capaz de incrementar o disminuir, respectivamente, la liberación de CGRP. Estos datos también apoyan las diferencias en la liberación de CGRP observadas entre SHR y WKY, ya que en hipertensión se ha descrito un aumento en la expresión de TRPV1 (Wang *et al.*, 2005) y una disfunción de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Remie *et al.*, 1992). Estos resultados ponen de manifiesto que existen una multitud de factores de distinta naturaleza, relacionados con la hipertensión, que modulan la liberación de CGRP (González-Hernández *et al.*, 2016).

Se ha descrito que las hormonas sexuales pueden modificar la liberación de CGRP, aunque existen resultados contradictorios. Así, en el estudio realizado por Sun *et al.* (2001) se ha observado que tras un mes de orquidectomía los niveles plasmáticos de CGRP se incrementaban, mientras que después de cuatro meses de la pérdida de función gonadal dichos niveles disminuían. El tratamiento de reemplazo hormonal con TES revertía dichas alteraciones. También ha sido descrito que la administración de 5 $\alpha$ -DHT a neuronas procedentes de ganglios de la raíz dorsal disminuía la liberación de CGRP (Zhao *et al.*, 2011); el mismo estudio mostraba que la administración de 5 $\alpha$ -DHT a ratones durante 3 semanas también disminuía los niveles plasmáticos de CGRP. Los resultados descritos en esta Tesis mostraron que la incubación con TES, 5 $\alpha$ -DHT o 5 $\beta$ -DHT no modificó la liberación de CGRP inducida por EE en arterias procedentes de ratas SHR o WKY. Estos resultados parecen estar de acuerdo con un estudio previo del grupo

---

investigador, realizado en AM de ratas SD macho, en dónde se describe que las hormonas sexuales endógenas no modificaban la función de la innervación sensitiva ya que en presencia de la neurotoxina sensitiva capsaicina (Li y Duckles, 1992; Ferdinandy *et al.*, 1997) la respuesta vasomotora inducida por EE no se vio alterada ni en AM de ratas controles ni de ratas gonadectomizadas (Martín *et al.*, 2005). Aunque queda demostrado que la incubación con TES o con sus derivados 5-dihidroreducidos no modifica la liberación de CGRP, no se puede descartar el efecto sobre la vasodilatación inducida por el CGRP como será discutido en el apartado correspondiente.

En cuanto a la liberación de NA, la aplicación de estímulos eléctricos a anillos de AM de ratas SHR y WKY incrementó significativamente la liberación de NA (Figura 21 A y B), lo que coincide con numerosos estudios que han mostrado que la terminación nerviosa adrenérgica libera NA en respuesta a la EE (Kuchii *et al.*, 1973; Wali y Greenidge, 1989) tanto en AM de ratas SHR (Ferrer *et al.*, 2004a) como en ratas WKY (Tanaka *et al.*, 2004). Al comparar la liberación inducida por EE entre arterias procedentes de cada una de las dos cepas, no se obtuvieron diferencias significativas. Sin embargo, es bien conocido que existe hiperactividad del sistema nervioso simpático en SHR (Buñag y Takeda, 1979; Judy *et al.*, 1976) y se ha reportado una mayor liberación de NA por EE en SHR que en WKY (Ekas y Lokhandwala, 1981; Tsuda *et al.*, 1984), lo que contribuye al desarrollo de la HA en SHR. Sin embargo, también se conocen modelos experimentales en los que la liberación es similar (Westfall *et al.*, 1987), y trabajos en los que no existen diferencias en la liberación de NA entre SHR y WKY (del Campo *et al.*, 2009), o incluso trabajos que reportan una menor liberación en ratas que cursan hipertensión en comparación con ratas normotensas (Sastre *et al.*, 2012). Además, está ampliamente descrito que la liberación de NA por las terminaciones nerviosas simpáticas está regulada a nivel de receptores presinápticos activados por una variedad de sustancias como prostaglandinas, angiotensina II (Ang II), adenosina y la propia NA liberada. Los mecanismos de control a través de estas sustancias vasoactivas podrían estar alterados en los lechos vasculares de SHR, pudiendo modificar la liberación de NA y contribuyendo a la patogénesis de la hipertensión. Por ejemplo, el sistema renina-angiotensina

(SRA) sumamente importante en la patología de la hipertensión, además del efecto vasoconstrictor directo y de activar la liberación de aldosterona, es capaz de aumentar la neurotransmisión simpática especialmente en SHR (Maranon y Reckelhoff, 2016). Sin embargo, el descubrimiento de un nuevo eje perteneciente al SRA, angiotensina 1-7 (Ang 1-7) /receptor Mas, ha indicado la complejidad en los efectos causados por el SRA. Así, se ha demostrado que Ang 1-7 atenúa la activación del sistema simpático, siendo este efecto más notable en arterias de SHR que de WKY, actuando como sistema compensador de los efectos inducidos por Ang II (Byku *et al.*, 2009). El hecho que nuestros resultados no muestren diferencias significativas en la liberación de NA entre SHR y WKY podría deberse a diferencias en las condiciones experimentales, tales como la edad de los animales que puede provocar modificaciones funcionales del eje SRA/Ang 1-7/receptor Mas.

Se ha reportado por un lado que la castración a corto plazo disminuye la liberación de NA (Lara *et al.*, 1985) y que los andrógenos, en concreto la TES, conducen a un incremento en los niveles de NA en diferentes lechos vasculares (Kumai *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1998). Sin embargo, en otros trabajos se ha descrito que la TES puede reducir la liberación de NA desde la terminación nerviosa simpática (Wang *et al.*, 2012). En nuestro trabajo los resultados mostraron que la incubación con andrógenos no modificó significativamente la liberación de NA. A este respecto, la eliminación de la función gonadal en ratas macho SD durante 5 meses, tampoco modificó la liberación de NA inducida por EE (del Campo *et al.*, 2008). Como puede observarse, existen controversias en cuanto al efecto de los andrógenos sobre la liberación de NA probablemente como consecuencia de las diferencias en la edad de los animales de experimentación y de la concentración y tiempo de incubación de los andrógenos utilizados.

#### Efectos de los andrógenos sobre las respuestas vasomotoras inducidas por NO, CGRP y NA

En este estudio también se analizó la posible influencia de los andrógenos sobre las respuestas vasomotoras inducidas por los neurotransmisores liberados que pudieran estar contribuyendo al efecto

---

hipotensor de los andrógenos. Para analizar la respuesta inducida por NO se utilizó el compuesto NPS, donante de NO, que produjo una vasorelajación dependiente de la concentración en anillos de AM de ratas WKY y SHR precontraídos con NA. Nuestros resultados muestran que no existe una diferencia significativa entre la respuesta vasodilatadora de NPS en animales SHR frente a animales WKY como se ha reportado previamente (Girouard *et al.*, 2001; Sastre *et al.*, 2012). En los segmentos arteriales de animales SHR incubados con TES y 5 $\beta$ -DHT la respuesta inducida por NPS se vio importantemente incrementada con respecto a la situación control (ausencia de andrógenos). En anillos de AM de ratas WKY, únicamente 5 $\beta$ -DHT produjo un incremento en la relajación inducida por NPS, siendo menor que el observado en arterias de SHR. Ambos resultados se podrían explicar por las propiedades antioxidantes de los andrógenos que varios estudios han demostrado (Békési *et al.*, 2000, Yorek *et al.*, 2002) aumentando así la biodisponibilidad del NO (Gryglewski *et al.*, 1986; Ferrer *et al.*, 2000b, 2001a). En base a estos resultados, también habría que tener en cuenta los efectos descritos de los andrógenos sobre canales de potasio (Yue *et al.*, 1995; Deenadayalu *et al.*, 2001) ya que parte de la relajación inducida por NPS, se debe a mecanismos hiperpolarizantes en los que están participando la activación de canales de potasio (Sagredo *et al.*, 2013). Asimismo, no se deberían descartar los efectos de los andrógenos sobre segundos mensajeros como el GMPc (Deenadayalu *et al.*, 2001) y el AMPc (Montaño *et al.*, 2008), ya que éstos pueden modular diferentes vías de señalización que incrementan la vasodilatación. Aparte de la modificación específica que subyace al efecto de los andrógenos sobre la vasodilatación inducida por NPS, es importante destacar que el mayor efecto de 5 $\beta$ -DHT sobre la respuesta a NPS observado en arterias de SHR vs. a las de WKY puede contribuir al potente efecto antihipertensivo de 5 $\beta$ -DHT observado en ratas conscientes.

Respecto a la vasodilatación inducida por CGRP, indicar que nuestros resultados mostraron que dicha respuesta fue menor en SHR que en WKY. Sin embargo, otros trabajos han reportado que CGRP induce respuestas vasodilatadoras similares en arterias de ratas WKY o SHR (Márquez-Rodas *et al.*, 2006). También existen estudios que han descrito una mayor respuesta

vasodilatadora inducida por CGRP en segmentos arteriales de SHR en comparación con WKY (Kawasaki *et al.*, 1990), lo que se podría explicar teniendo en cuenta que en hipertensión tanto la liberación de CGRP como su efecto vasodilatador parece que están incrementados. Se ha comentado anteriormente que las condiciones experimentales pueden modificar el resultado de las investigaciones. En este sentido, es importante destacar que todos los anillos arteriales usados en esta tesis presentaban endotelio, y el endotelio de SHR pudiera estar liberando factores contráctiles (Briones y Touyz, 2010) que contrarresten el efecto vasodilatador del CGRP.

Respecto al efecto de los andrógenos sobre la respuesta vasodilatadora a CGRP, los resultados muestran que la TES, y especialmente 5 $\beta$ -DHT, incrementaron dicha respuesta sólo en arterias de ratas SHR. Aunque no existen estudios analizando específicamente el efecto de TES -y menos aún del 5 $\beta$ -DHT- en la respuesta inducida por CGRP en arterias de ratas SHR, se ha descrito que los esteroides sexuales femeninos aumentan la respuesta vasodilatadora al CGRP en AM de ratas (Yallampalli *et al.*, 2004), a través del aumento en la expresión de diferentes componentes del receptor a CGRP (Lei *et al.*, 1994) y en la participación de canales de potasio (Gangula *et al.*, 2004). Lo más notable es que nuestros resultados indican que el aumento en la vasodilatación inducida por CGRP es otro importante mecanismo en el efecto antihipertensivo de la TES y en especial de 5 $\beta$ -DHT, observado en las SHR conscientes.

Respecto a la respuesta contráctil inducida por NA, los resultados mostraron que no existían diferencias significativas entre AM de SHR o WKY de acuerdo con lo reportado previamente (Sastre *et al.*, 2012; Bencze *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2016). Sin embargo, otros estudios han reportado que las respuestas vasocontráctiles están disminuidas (Marín *et al.*, 2000) o aumentadas (Muir y Wardle, 1989; Stephens *et al.*, 1991) en SHR, describiéndose además una mayor respuesta a agonistas del receptor adrenérgico  $\alpha_1$  en SHR (Vila *et al.*, 1993; Tabernero *et al.*, 1996). La diferencia en resultados, podría deberse a las condiciones experimentales de cada trabajo así como a la edad de las ratas: por ejemplo, los trabajos en los que se

---

reporta una diferencia en la respuesta contráctil inducida por NA entre WKY y SHR, las ratas son de máximo 15 semanas de edad, y en los trabajos que no se reporta diferencia, las ratas tienen una edad superior a las 20 semanas.

En referencia al efecto de los andrógenos sobre la respuesta a NA, nuestros resultados muestran que no hubo diferencias significativas entre los anillos de AM de SHR incubados con TES, 5 $\alpha$ - o 5 $\beta$ -DHT vs. los anillos incubados con el vehículo. Mientras que en WKY, fue 5 $\beta$ -DHT quien únicamente produjo una disminución en el efecto máximo contráctil inducido por NA respecto a lo observado en presencia del vehículo. Existen resultados contradictorios, ya que varios estudios reportan que los andrógenos no modifican (Jones *et al.*, 2003; Tatchum-Talom *et al.*, 2011), aumentan (Martín *et al.*, 2005) o disminuyen (Cignarella *et al.*, 2000) dicha respuesta. Esta variedad en los resultados, se puede atribuir tanto a diferencias en la edad de los animales como a diferencias en el modelo de experimentación; por ejemplo, la duración de la privación hormonal o la duración del tratamiento de reemplazo hormonal pueden influir en la reactividad de los vasos sanguíneos, alterando la respuesta vascular a diferentes agentes vasoactivos.

#### Efecto de los andrógenos sobre la respuesta vasomotora a EE

Como ha sido discutido anteriormente, en respuesta a EE, las terminaciones nerviosas perivasculares liberan diferentes neurotransmisores (como el NO, CGRP y NA analizados en este estudio) que producen efectos vasodilatadores o vasoconstrictores, provocando un efecto vasoconstrictor neto. Previamente, se ha demostrado que la respuesta inducida por EE fue suprimida por la tetrodotoxina (Marín *et al.*, 2000), lo que indicaba el origen neuronal de la contracción. La respuesta vasoconstrictora se debe principalmente a la liberación de NA desde las terminaciones nerviosas adrenérgicas que, tras actuar sobre receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, induce vasoconstricción (Ferrer y Balfagón, 2001b) ya que la utilización del bloqueante  $\alpha$ -adrenérgico, fentolamina, disminuyó el efecto contráctil (Ferrer *et al.*, 2003; del Campo *et al.*, 2009). Nuestros resultados muestran que no existe diferencia significativa en la respuesta inducida por EE entre AM de SHR y WKY, lo que está de acuerdo con resultados previamente descritos (Aras-López *et al.*,



2007). Sin embargo, contrastan con otras investigaciones en las que demuestran que el efecto vasoconstrictor inducido por EE es mayor en SHR que en WKY (Muir y Wardle, 1989; Stephens *et al.*, 1991; Marín, 1993; Yang *et al.*, 2004).

A pesar de la variedad en resultados existentes en la bibliografía, nuestros resultados ponen de manifiesto la capacidad de algunos andrógenos, en especial TES y 5 $\beta$ -DHT, de modificar la liberación y/o respuesta vasomotora a neurotransmisores. Por este motivo se analizó el efecto de la incubación con cada uno de los tres andrógenos sobre la respuesta inducida por EE. Los resultados mostraron que únicamente TES incrementó la respuesta contráctil inducida por EE en AM de SHR. Es importante recordar que en SHR: 1) los andrógenos no modificaron la liberación de los neurotransmisores NO, CGRP y NA, 2) los andrógenos no alteraron la respuesta contráctil inducida por NA, 3) TES y 5 $\beta$ -DHT aumentaron, de forma similar, la vasodilatación inducida por NPS y 4) 5 $\beta$ -DHT incrementó la vasodilatación inducida por CGRP en mayor medida que TES. Por tanto, el menor efecto potenciador de TES sobre la respuesta a CGRP respecto al observado con 5 $\beta$ -DHT, parece ser el responsable del mayor efecto contráctil inducido por EE en presencia de TES. Sin embargo, no se puede descartar la participación de otros neurotransmisores o mediadores liberados por EE que no han sido investigados en este estudio.

#### **4. Relación Estructura química – efectos fisiológicos de los andrógenos**

En el presente estudio, el orden de clasificación tanto de la eficacia como de la potencia hipotensora de los andrógenos sobre la PA fue: 5 $\beta$ -DHT > TES > 5 $\alpha$ -DHT. Claramente, tanto en ratas hipertensas como en normotensas, el andrógeno hipotensor más eficaz y potente fue 5 $\beta$ -DHT, mientras que, el menos potente fue su estereoisómero 5 $\alpha$ -DHT. Tanto TES como 5 $\alpha$ -DHT exhibieron eficacias similares pero mucho menores que 5 $\beta$ -DHT. En estudios previos se ha reportado que 5 $\beta$ -DHT mostró la mayor eficacia y potencia vasodepresora en ratas macho anestesiadas, desmeduladas (Perusquía y

---

Villalón, 2002) y en ratas macho normotensas conscientes (Perusquía *et al.*, 2015). Curiosamente, los niveles tisulares de la enzima 5 $\beta$ -reductasa, que cataliza la conversión de TES a 5 $\beta$ -DHT, son significativamente más bajos en los pacientes con hipertensión esencial en comparación con sus controles normotensos (Iki *et al.*, 1994).

Respecto a los resultados obtenidos en los experimentos de vasodilatación inducida por andrógenos tanto en vasos sanguíneos de conductancia como de resistencia, fue 5 $\beta$ -DHT quien presentó mayor potencia y eficacia vasodilatadora (ver Tabla 2) en comparación con su precursor, la TES y que su epímero, 5 $\alpha$ -DHT. Estos resultados están de acuerdo con datos obtenidos en estudios funcionales previos donde se describe que 5 $\beta$ -DHT exhibió la mayor potencia y eficacia vasorelajante (Perusquía *et al.*, 2007, 2012; Perusquía y Stallone, 2010).

En referencia a los datos obtenidos para el estudio del efecto de la incubación con andrógenos a una concentración de 10 nM sobre la innervación perivascular de AM, 5 $\beta$ -DHT fue quien incrementó en mayor medida la vasodilatación inducida tanto por NPS como por CGRP en SHR, acciones que pudieran estar implicadas en los efectos antihipertensivos descritos.

Podemos decir que tales resultados se han atribuido a que existe una relación entre la estructura química y la función biológica de los andrógenos. El análisis de la conformación estructural de la molécula androgénica muestra que la TES y su dihidroderivado 5 $\alpha$  poseen una estructura tridimensional plana con una unión *trans* del anillo de A/B. Por el contrario, su epímero 5 $\beta$  (5 $\beta$ -DHT) presenta una curvatura de 90° en la unión del anillo A/B formando una configuración *cis*. Esta diferente orientación espacial del hidrógeno en el C<sub>5</sub>, que confiere a estos andrógenos una diferente estructura tridimensional parece ser crucial en la eficacia y la potencia vasodilatadora (revisado por Perusquía *et al.*, 2007; Perusquía y Stallone, 2010; Perusquía *et al.*, 2012), ver Figura 18.

La relación estructura química-función biológica en el presente estudio está totalmente de acuerdo con hallazgos anteriores *in vitro* descritos en la AT

aislada de rata (Perusquía *et al.*, 1996), las arterias coronarias, femorales y la vena safena de perro (Perusquía *et al.*, 2012) y la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007). En otros estudios, 5 $\beta$ -DHT ha mostrado de nuevo la mayor eficacia y potencia vasodilatadora, así como una relación estructura-función biológica similar a la descrita, con los otros andrógenos usados para inducir relajación en diferentes tipos de músculo liso, como íleo de cobayo (Kubli-Garfias *et al.*, 1987), miometrio de rata y humano (Perusquía, 2001; Perusquía *et al.*, 2005), vaso deferente de rata (Lafayette *et al.*, 2008) y tráquea de cobayo (Montaño *et al.*, 2014).

### **5. Implicaciones clínicas**

Desde un punto de vista fisiológico, es importante destacar que cualquier reducción de la PAM mayor a 20 mmHg es fisiológicamente relevante, especialmente en el tratamiento de la hipertensión, ya que tal reducción en la PA sería claramente beneficiosa. De hecho, en el presente estudio, se observaron disminuciones de la PAM tanto en SHR (de  $\Delta$  30 a  $\Delta$  71 mmHg) como en su control normotenso WKY (de  $\Delta$  20 a  $\Delta$  34 mmHg) en respuesta a 5 $\beta$ -DHT. Con los efectos antihipertensivos de 5 $\beta$ -DHT en ratas hipertensas, es importante señalar que la caída de la PAM por debajo de 60 mmHg durante más de unos minutos, puede ocasionar daños en tejidos y órganos; sin embargo, la drástica reducción de la PA a la dosis más alta de 5 $\beta$ -DHT se observó durante 20-30 min, y hubo una recuperación parcial de la PA en la mayoría de los experimentos, hasta que la PA volvió a la normalidad en un tiempo aproximado de 90 min. Los resultados mostrados en animales hipertensos revelan un efecto antihipertensivo de los andrógenos que pueden desempeñar un importante papel en la regulación de la PA.

Del mismo modo, se observó que la deficiencia de andrógenos puede desencadenar el desarrollo de la hipertensión, sugiriendo que la deficiencia de andrógenos en varones pudiera contribuir a la HA. Dicha propuesta está de acuerdo con un estudio reciente en el que a hombres con hipogonadismo asociado con PA elevada se les administró una terapia de TES a largo plazo

---

(hasta ocho años) lo que les produjo una marcada y sostenida disminución gradual de la PA sistólica y diastólica (Haider *et al.*, 2016).

En consecuencia, los presentes hallazgos podrían proporcionar una mejor comprensión sobre el control de la PA por los andrógenos, y debería ser tomado en cuenta en estudios clínicos que actualmente estén investigando la terapia de reemplazo de andrógenos en hombres mayores. En conjunto, nuestro estudio apoya un papel de los esteroides sexuales masculinos en la modulación de la hipertensión en SHR. Los andrógenos también parecen influir en las vías de señalización contráctiles. Parece haber selectividad en estos efectos ya que no todos los vasoconstrictores fueron afectados por igual. Esta selectividad en la respuesta sugiere que es necesaria una mayor comprensión de los sitios y mecanismos de acción de los andrógenos en estas vías lo que pudiese ofrecer oportunidades para el desarrollo de fármacos en el futuro. Particularmente, el metabolito 5 $\beta$ -reducido de TES, 5 $\beta$ -DHT, posee efectos antihipertensivos excepcionales, con las siguientes características: (i) es un metabolito genómicamente inactivo, sin propiedades androgénicas, a diferencia de la acción androgénica principal de 5 $\alpha$ -DHT asociada con cáncer de próstata; (ii) es un andrógeno no aromatizable por lo que tampoco tiene propiedades estrogénicas, a diferencia de TES y (iii) posee una destacada acción vasorelajante tanto de manera directa como indirecta, modulando la liberación y efecto vasomotor de neurotransmisores vasodilatadores. El conjunto de estas características señala a este andrógeno como un excelente candidato para el tratamiento de la HA.

A este respecto, la suplementación con 5 $\beta$ -DHT en hombres mayores puede ser una mejor opción para el tratamiento del hipogonadismo que la terapia de reemplazo con TES. Además, ya que varios estudios clínicos han informado que la terapia de deprivación androgénica (ADT) aumenta el riesgo cardiovascular, especialmente en los hombres con enfermedades cardiovasculares preexistentes, 5 $\beta$ -DHT también podría ser utilizado en ADT que es la base del tratamiento farmacológico para el carcinoma de próstata.

## ***VIII. CONCLUSIONES***



1. La administración intravenosa de testosterona, 5 $\alpha$ -DHT y 5 $\beta$ -DHT produjo una rápida reducción de la PAM en SHR y ratas WKY conscientes. Por lo que la ya reportada vasorelajación periférica que inducen los andrógenos *in vitro* es operativa *in vivo* al producir una pérdida de la presión arterial en 1) ratas normotensas y 2) provocando una respuesta antihipertensiva en ratas hipertensas.

- El mecanismo de acción por el que el andrógeno 5 $\beta$ -DHT ejerce la respuesta antihipertensiva es directamente al bloquear la entrada de Ca<sup>2+</sup> de los CCDV-L, que previamente había sido activada por el agonista selectivo de la entrada de Ca<sup>2+</sup>, Bay K8644, en el sitio dihidropiridínico del CCDV-L.

2. La deficiencia de testosterona inducida por orquidectomía, y en general la deficiencia de andrógenos producidos por las gónadas, podría ser una de las causas de la hipertensión arterial y que podría prevenirse con una terapia de remplazo hormonal con testosterona.

3. La testosterona, 5 $\alpha$ -DHT y 5 $\beta$ -DHT son capaces de producir vasorelajación sobre la contracción inducida por KCl y Phe en la aorta torácica y en la arteria mesentérica aislada de ratas SHR y WKY, lo que demuestra su implicación en la respuesta antihipertensiva de los tres andrógenos.

- La mayor sensibilidad de la contracción inducida por KCl al efecto relajante de los andrógenos indica que existe una mayor participación del bloqueo de la entrada de calcio a través de los CCDV-L.

- La elevada capacidad de 5 $\beta$ -DHT para relajar arterias mesentéricas en respuesta a la vasoconstricción simpática, es especialmente relevante cuando existe hipertensión, lo que explicaría su acción antihipertensiva.

4. El incremento en la respuesta vasodilatadora inducida por el donante de NO, NPS, y el marcado efecto vasodilatador inducido por el CGRP en los anillos

---

mesentéricos de ratas SHR incubados con  $5\beta$ -DHT, podría explicar la marcada potencia y eficacia antihipertensiva de este andrógeno.

La rápida y efectiva respuesta antihipertensiva de  $5\beta$ -DHT, parece indicar que el tratamiento de la hipertensión con este andrógeno podría tener una importante utilidad terapéutica.



## ***IX. BIBLIOGRAFÍA***



- Ahmed S.A., Verthelyi D. (1993). Antibodies to cardiolipin in normal C57BL/6J mice: induction by estrogen but not dihydrotestosterone. *J Autoimmun.*, Jun;6(3):265-79.
- Álvarez E., Cairrão E., Morgado M., Morais C., Verde I. (2010). Testosterone and cholesterol vasodilation of rat aorta involves L-type calcium channel inhibition. *Adv Pharmacol Sci.*, 2010:534184.
- Aras-Lopéz R., Blanco-Rivero J., Xavier F.E., Salaices M., Ferrer M., Balfagón G. (2007). Dexamethasone decreases contraction to electrical field stimulation in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats through decreases in thromboxane A<sub>2</sub> release. *J Pharmacol Exp Ther.*, Sep;322(3):1129-36.
- Arribas S.M., Briones A.M., Bellingham C., González M.C., Salaices M., Liu K., Wang Y., Hinek A. (2008). Heightened aberrant deposition of hard-wearing elastin in conduit arteries of prehypertensive SHR is associated with increased stiffness and inward remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, Dec;295(6):H2299-307.
- Auchus R.J., Miller W.L. (2012). Defects in androgen biosynthesis causing 46,XY disorders of sexual development. *Semin Reprod Med.*, Oct;30(5):417-26.
- Bagatell C.J., Dahl K.D., Bremner W.J. (1994). The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estradiol. *J Androl.*, Jan-Feb;15(1):15-21.
- Barrett-Connor E.L. (1995) Testosterone and risk factors for cardiovascular disease in men. *Diabete Metab.*, 21:156-61.
- Barrett-Connor, E., Khaw, K.T. (1988). Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. A prospective population-based study. *Circulation*, 78, 539-45.
- Behuliak M., Pintérová M., Bencze M., Petrová M., Líšková S., Karen P., Kuneš J., Vaněčková I., Zicha J. (2013). Ca<sup>2+</sup> sensitization and Ca<sup>2+</sup> entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J J Hypertens.*, Oct;31(10):2025-35.
- Békési G., Kakucs R., Várbíró S., Rácz K., Sprintz D., Fehér J., Székács B. (2000). In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids*, Dec;65(12):889-94.
- Bencze M., Behuliak M., Vavříňová A., Zicha J. (2016). Altered contractile responses of arteries from spontaneously hypertensive rat: The role of endogenous mediators and membrane depolarization. *Life Sci.*, Dec 1;166:46-53.

- 
- Benten W.P., Lieberherr M., Giese G., Wrehlke C., Stamm O., Sekeris C.E., Mossmann H., Wunderlich F. (1999). Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J.*, Jan;13(1):123-33.
- Berridge M.J., Irvine R.F. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, Nov 22-28; 312(5992):315-21.
- Bhugra P., Gulati O.D. (1996). Interaction of calcium channel blockers with different antagonists in aorta from normal and diseased rats. *Indian J Physiol Pharmacol.*, Apr;40(2):120-6.
- Bissoli N.S., Medeiros A.R., Santos M.C., Busato V.C., Jarske R.D., Abreu G.R., Moysés M.R., de Andrade TU. (2009). Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. *Pharmacol Res.*, Jun;59(6):379-84.
- Blanco-Rivero J., Balfagón G., Ferrer M. (2005). Male castration increases neuronal nitric oxide synthase activity in the rat mesenteric artery through protein kinase C activation. *J Vasc Res.*, Nov-Dec;42(6):526-34.
- Blanco-Rivero J., Sagredo A., Balfagón G., Ferrer M. (2006a). Orchidectomy increase expression and activity of Cu/Zn-superoxide dismutase, while decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *J Endocrinol.*, Sep;190(3):771-8.
- Blanco-Rivero J., Aras-López R., Del Campo L., Sagredo A., Balfagón G., Ferrer M. (2006b). Orchidectomy increases beta-adrenoceptor activation-mediated neuronal nitric oxide and noradrenaline release in rat mesenteric artery. *Neuroendocrinology*, 84(6):378-85.
- Blanco-Rivero J., Balfagón G., Ferrer M. (2006c). Orchidectomy modulates alpha2-adrenoceptor reactivity in rat mesenteric artery through increased thromboxane A<sub>2</sub> formation. *J Vasc Res.*, 43(1):101-8.
- Blanco-Rivero J., Sagredo A., Balfagón G., Ferrer M. (2007). Protein kinase C activation increases endothelial nitric oxide release in mesenteric arteries from orchidectomized rats. *J Endocrinol.*, Jan;192(1):189-97.
- Blanco-Rivero J., Roque F.R., Sastre E., Caracuel L., Couto G.K., Avendaño M.S., Paula S.M., Rossoni L.V., Salaices M., Balfagón G. (2013). Aerobic exercise training increases neuronal nitric oxide release and bioavailability and decreases noradrenaline release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*, May;31(5):916-26.
- Bredt D.S., Ferris C.D., Snyder S.H. (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem.*, Jun 5;267(16):10976-81.

- Briones A.M., González J.M., Somoza B., Giraldo J., Daly C.J., Vila E., González M.C., McGrath J.C., Arribas S.M. (2003). Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J Physiol.*, Oct 1;552(Pt 1):185-95.
- Briones A.M., Touyz R.M. (2010). Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep.*, Apr;12(2):135-42.
- Buñag R.D., Takeda K. (1979). Sympathetic hyperresponsiveness to hypothalamic stimulation in young hypertensive rats. *Am J Physiol.*, Jul;237(1):R39-44.
- Byku M., Macarthur H., Westfall T.C. (2009). Inhibitory effects of angiotensin-(1-7) on the nerve stimulation-induced release of norepinephrine and neuropeptide Y from the mesenteric arterial bed. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, Feb;298(2):H457-65.
- Byrom F.B., Wilson C. (1938). A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. *J Physiol.*, Aug 15;93(3):301-4.
- Cairrão E., Álvarez E., Santos-Silva A. J., Verde I. (2008). Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, Jan;376(5):375-83.
- Cairrão E., Santos-Silva A.J., Verde I. (2010). PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Eur J Pharmacol.*, Aug 25;640(1-3):94-101.
- Chen Y.F., Meng Q.C. (1991). Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci.*, 48(1):85-96.
- Chen Q.Q., Li D., Guo R., Luo D., Yang J., Hu C.P., Li Y.J. (2008). Decrease in the synthesis and release of calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia of spontaneously hypertensive rat: role of nitric oxide synthase inhibitors. *Eur J Pharmacol.*, Oct 31;596(1-3):132-7.
- Chou T. M., Sudhir K., Hutchison S. J., Ko E, Amidon TM, Collins P, Chatterjee K. (1996). Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries *in vivo*. *Circulation*, Nov 15;94(10):2614-9.
- Chou C.H., Lin C.L., Lin M.C., Sung F.C., Kao C.H. (2015). 5 $\alpha$ -Reductase inhibitors increase acute coronary syndrome risk in patients with benign prostate hyperplasia. *J Endocrinol Invest.*, Jul;38(7):799-805.
- Cignarella A., Bolego C., Pinna C., Zanardo R., Nardi F., Zancan V., Puglisi L. (2000). Androgen deprivation, estrogen treatment and vascular function in male rat aorta. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, Feb;361(2):166-72.

- 
- Corona G., Maseroli E., Rastrelli G., Isidori A.M., Sforza A., Mannucci E., Maggi M. (2014). Cardiovascular risk associated with testosterone-boosting medications: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf.*, Oct;13(10):1327-51.
- Costarella C.E., Stallone J.N., Rutecki G.W., Whittier F.C. (1996). Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J Pharmacol Exp Ther.*, Apr;277(1):34-9.
- Crews J.K., Khalil R.A. (1999). Gender-specific inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  entry mechanism of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 26:707–15.
- Damron D.S., Kanaya N., Homma Y., Kim S.O., Murray P.A. (2002). Role of PKC, tyrosine kinases, and Rho kinase in alpha-adrenoreceptor-mediated PASM contraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, Nov;283(5):L1051-64.
- Danaei G, Finucane MM, Lin JK, Singh GM, Paciorek CJ, Cowan MJ, Farzadfar F, Stevens GA, Lim SS, Riley LM, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Pressure). (2011). National, regional, and global trends in systolic blood pressure since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 786 country-years and 5.4 million participants. *Lancet*, Feb 12;377(9765):568-77.
- De Witt B.J., Kaye A.D., Ibrahim I.N., Bivalacqua T.J., D'Souza F.M., Banister R.E., Arif A.S., Nossaman B.D. (2001). Effects of PKC isozyme inhibitors on constrictor responses in the feline pulmonary vascular bed. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, Jan;280(1):L50-7.
- Deenadayalu V.P., White R.E., Stallone J.N., Gao X., Garcia A.J. (2001). Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, Oct;281(4):H1720-7.
- Deenadayalu V., Puttabyatappa Y., Liu A.T., Stallone J.N., White R.E. (2012). Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels via the cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, Jan 1;302(1):H115-23.
- del Campo L., Sagredo A., Aras-López R., Balfagón G., Ferrer M. (2008). Orchidectomy increases the formation of non-endothelial thromboxane  $\text{A}_2$  and modulates its role in the electrical field stimulation-induced response in rat mesenteric artery. *J Endocrinol.*, May;197(2):371-9.
- del Campo L., Ferrer M., Balfagón G. (2009). Hypertension alters the function of nitrgergic and sensory innervation in mesenteric arteries from female rats. *J Hypertens*, Apr;27(4):791-9.

- del Campo M., Sagredo A., del Campo L., Villalobo A., Ferrer M. (2014). Time-dependent effect of orchidectomy on vascular nitric oxide and thromboxane A<sub>2</sub> release. Functional implications to control cell proliferation through activation of the epidermal growth factor receptor. *PLoS One*. Jul 11;9(7):e102523.
- Ding A.Q., Stallone J.N. (2001). Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K<sup>+</sup> channel activation. *J Appl Physiol* (1985)., Dec;91(6):2742-50.
- Eguchi S., Tezuka S., Hobara N., Akiyama S., Kurosaki Y., Kawasaki H. (2004). Vanilloid receptors mediate adrenergic nerve- and CGRP-containing nerve-dependent vasodilation induced by nicotine in rat mesenteric resistance arteries. *Br J Pharmacol.*, Aug;142(7):1137-46.
- Ekas R.D., Lokhandwala M.F. (1981). Sympathetic nerve function and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, Nov;241(5):R379-84.
- English K.M., Steeds R., Jones T.H., Channer K.S. (1997). Testosterone and coronary heart disease: is there a link? *QJM.*, Dec;90(12):787-91.
- English K.M., Jones R.D., Channer K.S., Jones T.H. (2000). The coronary vasodilatory effect of testosterone is mediated at the cell membrane, not by an intracellular receptor. *J Endocrinol.*, 164:296.
- English K.M., Jones R.D., Jones T.H., Morice A.H., Channer K.S. (2001). Gender differences in the vasomotor effects of different steroid hormones in rat pulmonary and coronary arteries. *Horm Metab Res.*, Nov;33(11):645-52.
- Fang H., Tong W., Branham W.S., Moland C.L., Dial S.L., Hong H., Xie Q., Perkins R., Owens W., Sheehan D.M. (2003). Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem Res Toxicol.*, Oct;16(10):1338-58.
- Farhat M., Lavigne M., Ramwell P. (1996). The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.*, Apr;10(5):615-24.
- Ferdinandy P., Csont T., Csonka C., Török M., Dux M., Németh J., Horváth L.I., Dux L., Szilvássy Z., Jancsó G. (1997). Capsaicin-sensitive local sensory innervation is involved in pacing-induced preconditioning in rat hearts: role of nitric oxide and CGRP? *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, Sep;356(3):356-63.
- Ferrer M., Marín J., Balfagón G. (2000a). Diabetes alters neuronal nitric oxide release from rat mesenteric arteries. Role of protein kinase C. *Life Sci.*, 66(4):337-45.
- Ferrer M., Alonso M.J., Salaices M., Marín J., Balfagón G. (2000b). Increase in neurogenic nitric oxide metabolism by endothelin-1 in mesenteric arteries from hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.*, Nov;36(5):541-7.

- 
- Ferrer M., Alonso M.J., Salaices M., Marín J., Balfagón G. (2001a). Angiotensin II increases neurogenic nitric oxide metabolism in mesenteric arteries from hypertensive rats. *Life Sci.*, Jan 26;68(10):1169-79.
- Ferrer M., Balfagón G. (2001b). Aging alters neuronal nitric oxide release from rat mesenteric arteries: role of presynaptic  $\beta$ -adrenoceptors. *Clin Sci (Lond)*, Oct;101(4):321-8.
- Ferrer M., Sánchez M., Minoves N., Salaices M., Balfagón G. (2003). Aging increases neuronal nitric oxide release and superoxide anion generation in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res.*, Nov-Dec;40(6):509-19.
- Ferrer M., Salaices M., Balfagón G. (2004a). Endogenous Prostacyclin Increases Neuronal Nitric Oxide Release in Mesenteric Artery From Spontaneously Hypertensive Rats. *Eur J Pharmacol.*, Dec 15;506(2):151-6.
- Ferrer M., Sánchez M., Martín M.C., Márquez-Rodas I., Alonso M.J., Salaices M., Balfagón G. (2004b). Protein kinase A increases electrical stimulation-induced neuronal nitric oxide release in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol.*, Mar 8;487(1-3):167-73.
- Filová B., Ostatníková D., Celec P., Hodosy J. (2013). The effect of testosterone on the formation of brain structures. *Cells Tissues Organs.*, 197(3):169-77.
- Flores-Soto E., Reyes-García J., Carbajal-García A., Campuzano-Gonzalez E., Perusquía M., Sommer B., Montañó L.M. (2017). Sex steroids effects on guinea pig airway smooth muscle tone and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  basal levels. *Mol Cell Endocrinol.*, 439:444-56.
- Gallet C., Blaie S., Lévy-Toledano S., Habib A. (2003). Thromboxane-induced ERK phosphorylation in human aortic smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol.*, 525:71-3.
- Gangula P.R., Zhao H., Supowit S.C., Wimalawansa S.J., Dipette D.J., Westlund K.N., Gagel R.F., Yallampalli C. (2000). Increased blood pressure in  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide/calcitonin gene knockout mice. *Hypertension*, Jan;35(1 Pt 2):470-5.
- Gangula P.R., Lanlua P., Bukoski R.D., Wimalawansa S.J., Yallampalli C. (2004). Mesenteric arterial relaxation to calcitonin gene-related peptide is increased during pregnancy and by sex steroid hormones. *Biol Reprod.*, Nov;71(5):1739-45.
- Ganten U., Schröder G., Witt M., Zimmermann F., Ganten D., Stock G. (1989). Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens.*, Sep;7(9):721-6.
- Gao Y., Tang S., Zhou S., Ware J.A. (2001). The thromboxane  $\text{A}_2$  receptor activates mitogen- activated protein kinase via protein kinase C-dependent



- Gi coupling and Src- dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Pharmacol Exp Ther.*, Feb;296(2):426-33.
- Geary G.G., Krause D.N., Duckles S.P. (2000). Gonadal hormones affect diameter of male rat cerebral arteries through endothelium-dependent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, Aug;279(2):H610-8.
- Girouard H., Chulak C., Lejossec M., Lamontagne D., de Champlain J. (2001). Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*, Aug;19(8):1369-77.
- González-Hernández A., Marichal-Cancino B.A., Lozano-Cuenca J., López-Canales J.S., Muñoz-Islas E., Ramírez-Rosas M.B., Villalón C.M. (2016). Heteroreceptors Modulating CGRP Release at Neurovascular Junction: Potential Therapeutic Implications on Some Vascular-Related Diseases. *Biomed Res Int.*, 2016:2056786.
- Gryglewski R.J., Palmer R.M., Moncada S. (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, Apr 3- 9;320(6061):454-6.
- Gutiérrez M., Martínez V., Cantabrana B., Hidalgo A. (1994). Genomic and non-genomic effects of steroidal drugs on smooth muscle contraction in vitro. *Life Sci.*, 55(6):437-43.
- Haider A., Yassin A., Haider K.S., Doros G., Saad F., Rosano G.M. (2016). Men with testosterone deficiency and a history of cardiovascular diseases benefit from long-term testosterone therapy: observational, real-life data from a registry study. *Vasc Health Risk Manag.*, Jun 14;12:251-61.
- Hall J., Jones R.D., Jones T.H., Channer K.S., Peers C. (2006). Selective inhibition of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology*, Jun;147(6):2675-80.
- Hatanaka Y., Hojo Y., Mukai H., Murakami G., Komatsuzaki Y., Kim J., Ikeda M., Hiragushi A., Kimoto T., Kawato S. (2015). Rapid increase of spines by dihydrotestosterone and testosterone in hippocampal neurons: Dependence on synaptic androgen receptor and kinase networks. *Brain Res.*, Sep 24;1621:121-32.
- Heinlein C.A., Chang C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev.*, Apr;23(2):175-200.
- Hirata K., Kuroda R., Sakoda T., Katayama M., Inoue N., Suematsu M., Kawashima S., Yokoyama M. (1995). Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. *Hypertension*, Feb;25(2):180-5.
- Hirst G.D., Edwards F.R. (1989). Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev.*, Apr;69(2):546-604.
- Honda H., Unemoto T., Kogo H. (1999). Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, Dec;34(6):1232-6.

- 
- Hu J., Zhang Z., Shen W.J., Azhar S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond)*., Jun 1;7:47.
- Hughes S., Mathur R.S., Margolius H.S. (1989). Sex steroid hormones are altered in essential hypertension. *J Hypertens.*, Mar;7(3):181-7.
- Iams S.G., Wexler B.C. (1977). Retardation in the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy. *J Lab Clin Med.*, Dec;90(6):997-1003.
- Iki K., Miyamori I., Hatakeyama H., Yoneda T., Takeda Y., Takeda R., Dai Q.L. (1994). The activities of 5 beta-reductase and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in essential hypertension. *Steroids*, Nov;59(11):656-60.
- Isidori A.M., Buvat J., Corona G., Goldstein I., Jannini E.A., Lenzi A., Porst H., Salonia A., Traish A.M., Maggi M. (2014). A critical analysis of the role of testosterone in erectile function: from pathophysiology to treatment- a systematic review. *Eur Urol.*, Jan;65(1):99-112.
- Jones T.J., Dunphy G., Milsted A., Ely D. (1998). Testosterone effects on renal norepinephrine content and release in rats with different Y chromosomes. *Hypertension*, Nov;32(5):880-5.
- Jones R.D., English K.M., Pugh P.J., Morice A.H., Jones T.H., Channer K.S. (2002). Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 39:814-823
- Jones R.D., Pugh P.J., Hall J., Channer K.S., Jones T.H. (2003). Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse. *Eur J Endocrinol.*, Jan;148(1):111-20
- Jones T.H. (2010). Testosterone deficiency: a risk factor for cardiovascular disease? *Trends Endocrinol Metab.*, Aug;21(8):496-503.
- Judy W.V., Watanabe A.M., Henry D.P., Besch H.R., Murphy W.R., Hockel G.M. (1976). Sympathetic nerve activity: role in the regulation of blood pressure in the SHR. *Circ Res.*, Jun;38(6 Suppl 2):21-9.
- Kawasaki H., Takasaki K., Saito A., Goto K. (1988). Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature*, Sep 8;335(6186):164-7.
- Kawasaki H., Saito A., Takasaki K. (1990). Changes in calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing vasodilator nerve activity in hypertension. *Brain Res.*, Jun 4;518(1-2):303-7.
- Kelly, D.M., Jones, T.H. (2013). Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *J. Endocrinol.*, May 7;217(3):R47-71.
- Kelly D.M., Jones T.H. (2015). Testosterone and obesity. *Obes Rev.*, Jul;16(7):581-606.

- Khalil R.A., Van Breemen C. (1988). Sustained contraction of vascular smooth muscle: calcium influx or C-kinase activation? *J Pharmacol Exp Ther.*, Feb;244(2):537-42.
- Khaw K.T., Barrett-Connor E. (1988). Blood pressure and endogenous testosterone in men: an inverse relationship. *J. Hypertens.*, Apr;6(4):329-32.
- Krone N., Hanley N.A., Arlt W. (2007). Age-specific changes in sex steroid biosynthesis and sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, Sep;21(3):393-401.
- Kubli-Garfias C., Medina-Jimenez M., Garcia-Yanez E., Vazquez-Alvarez A., Perusquía M., Gómez-García N., Almanza J., Ibáñez R., Rodríguez R. (1987). Relaxant action of androgens, progestins and corticosteroids on the isolated ileum of the guinea pig. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.*, 37(3):357-64.
- Kuchii M., Miyahara J. T., Shibata S. (1973). [<sup>3</sup>H]-adenine nucleotide and [<sup>3</sup>H]-noradrenaline release evoked by electrical field stimulation, perivascular nerve stimulation and nicotine from the taenia of the guinea-pig caecum. *Br J Pharmacol.*, Oct; 49(2): 258–66.
- Kumai T., Tanaka M., Watanabe M., Matsumoto C., Kobayashi S. (1994). Possible involvement of androgen in increased norepinephrine synthesis in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol.*, Dec;66(4):439-44.
- Lafayette S.S., Vladimirova I., Garcez-do-Carmo L., Monteforte P.T., Caricati N.A., Jurkiewicz A. (2008). Evidence for the participation of calcium in non-genomic relaxations induced by androgenic steroids in rat vas deferens. *Br J Pharmacol.*, Mar;153(6):1242-50.
- Lahera V., Navarro-Cid J., Cachofeiro V., García-Estañ J., Ruilope L.M. (1997). Nitric oxide, the kidney, and hypertension. *Am J Hypertens.*, Jan;10(1):129-40.
- Lara H., Galleguillos X., Arrau J., Belmar J. (1985). Effect of castration and testosterone on norepinephrine storage and on the release of [<sup>3</sup>H]norepinephrine from rat vas deferens. *Neurochem Int.*, 7(4):667-74.
- Lechleitner P., Genser N., Mair J., Dienstl A., Haring C., Wiedermann C.J., Puschendorf B., Saria A., Dienstl F. (1992). Calcitonin gene-related peptide in patients with and without early reperfusion after acute myocardial infarction. *Am Heart J.*, Dec;124(6):1433-9.
- Lei S., Mulvany M.J., Nyborg N.C. (1994). Characterization of the CGRP receptor and mechanisms of action in rat mesenteric small arteries. *Pharmacol Toxicol.*, Feb;74(2):130-5.

- 
- Li Y.J., Duckles S.P. (1992). Effect of endothelium on the actions of sympathetic and sensory nerves in the perfused rat mesentery. *Eur J Pharmacol.*, Jan 7;210(1):23-30.
- Lieberherr M., Grosse B. (1994). Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem.*, Mar 11;269(10):7217-23.
- Malkin C.J., Jones R.D., Jones T.H., Channer K.S. (2006a). Effect of testosterone on ex vivo vascular reactivity in man. *Clin Sci (Lond.)*, Oct;111(4):265-74.
- Malkin C.J., Pugh P.J., West J.N., van Beek E.J., Jones T.H., Channer K.S. (2006b). Testosterone therapy in men with moderate severity heart failure: a double-blind randomized placebo controlled trial. *Eur Heart J.*, Jan;27(1):57-64.
- Malgor L.A., Barrios L., Blanc C.C. (1975). Effects of testosterone on bone marrow erythroid cells of normal and nephrectomized rats. *Acta Physiol Lat Am.*, 25(3):179-87.
- Maranon R.O., Reckelhoff J.F. (2016). Mechanisms responsible for postmenopausal hypertension in a rat model: Roles of the renal sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system. *Physiol Rep.*, Feb;4(2). pii: e12669.
- Marín J. (1993). Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J Auton Pharmacol.*, Apr;13(2):127-76.
- Marín J., Ferrer M., Balfagón G. (2000). Role of protein kinase C in electrical-stimulation- induced neuronal nitric oxide release in mesenteric arteries from hypertensive rats. *Clin Sci (Lond.)*, Oct;99(4):277-83.
- Mårin P., Holmäng S., Jönsson L., Sjöström L., Kvist H., Holm G., Lindstedt G., Björntorp P. (1992). The effects of testosterone treatment on body composition and metabolism in middle-aged obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, Dec;16(12):991-7.
- Márquez-Rodas I., Longo F., Aras-López R., Blanco-Rivero J., Diéguez E., Tejerina T., Ferrer M., Balfagón G. (2006). Aldosterone increases RAMP1 expression in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Regul Pept.*, Mar 15;134(1):61-6.
- Marrachelli V.G., Miranda F.J., Centeno J.M., Salom J.B., Torregrosa G., Jover-Mengual T., Pérez A.M., Moro M.A., Alborch E. (2010). Role of NO-synthases and cyclooxygenases in the hyperreactivity of male rabbit carotid artery to testosterone under experimental diabetes. *Pharmacol Res.*, Jan;61(1):62-70.
- Martín M.C., Balfagón G., Minoves N., Blanco-Rivero J., Ferrer M. (2005). Androgen deprivation increases neuronal nitric oxide metabolism and its

- vasodilator effect in rat mesenteric arteries. *Nitric Oxide*, May;12(3):163-76.
- Martorell A., Blanco-Rivero J., Aras-López R., Sagredo A., Balfagón G., Ferrer M. (2008). Orchidectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in the acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta. *Cardiovasc Res.*, Feb 1;77(3):590-9.
- Mendelsohn M.E., Karas R.H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.*, Jun 10;340(23):1801-11.
- Miller W.L., Auchus R.J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.*, Feb;32(1):81-151.
- Mindnich R., Möller G., Adamski J. (2004). The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol.*, Apr 15;218(1-2):7-20.
- Montaño L.M., Calixto E., Figueroa A., Flores-Soto E., Carbajal V., Perusquía M. (2008). Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity, and  $5\beta$ -dihydrotestosterone restricted to L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockade. *Endocrinology*, May;149(5):2517-26.
- Montaño L.M., Espinoza J., Flores-Soto E., Chávez J., Perusquía M. (2014). Androgens are bronchoactive drugs that act by relaxing airway smooth muscle and preventing bronchospasm. *J Endocrinol.*, Jul;222(1):1-13.
- Morgentaler A., Miner M.M., Caliber M., Guay A.T., Khera M., Traish A.M. (2015). Testosterone therapy and cardiovascular risk: advances and controversies. *Mayo Clin Proc.*, Feb;90(2):224-51.
- Morris P.D., Channer K.S. (2012). Testosterone and cardiovascular disease in men. *Asian J Androl.*, May;14(3):428-35.
- Muir T.C., Wardle K.A. (1989). Vascular smooth muscle responses in normo- and hypertensive rats to sympathetic nerve stimulation and putative transmitters. *J Auton Pharmacol.*, Feb;9(1):23-34.
- Nakane M., Mitchell J., Förstermann U., Murad F. (1991). Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun.*, Nov 14;180(3):1396-402.
- Navarro-Dorado J., Orensanz L.M., Recio P., Bustamante S., Benedito S., Martínez A.C., García-Sacristán A., Prieto D., Hernández M. (2008). Mechanisms involved in testosterone-induced vasodilatation in pig prostatic small arteries. *Life Sci.*, 83:569-73.
- Nelson L.R., Bulun S.E. (2001). Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.*, Sep;45(3 Suppl):S116-24.

- 
- Nishimura K., Ota M., Ito K. (1991). Existence of two components in the tonic contraction of rat aorta mediated by  $\alpha_1$ -adrenoceptor activation. *Br J Pharmacol.*, Jan;102(1):215-21.
- Nishizuka Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, Oct 23;258(5082):607-14.
- O'Reilly M.W., House P.J., Tomlinson J.W. (2014). Understanding androgen action in adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, Sep;143:277-84.
- Oeckler R.A., Kaminski P.M., Wolin M.S. (2003). Stretch enhances contraction of bovine coronary arteries via an NAD(P)H oxidase-mediated activation of the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade. *Circ Res.*, Jan 10;92(1):23-31.
- Ohara Y., Sayegh H.S., Yamin J.J., Harrison D.G. (1995). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C. *Hypertension*, Mar;25(3):415-20.
- Oloyo A.K., Sofola O.A., Yakubu M.A. (2016). Orchidectomy attenuates high-salt diet-induced increases in blood pressure, renovascular resistance, and hind limb vascular dysfunction: role of testosterone. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, Sep;43(9):825-33.
- Olsen N.J., Olson G., Viselli S.M., Gu X., Kovacs W.J. (2001). Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology*, Mar;142(3):1278-83.
- Otani H., Otani H., Das D.K. (1988).  $\alpha_1$ -Adrenoceptor-mediated phosphoinositide breakdown and inotropic response in rat left ventricular papillary muscles. *Circ Res.*, Jan;62(1):8-17.
- Penning T.M., Burczynski M.E., Jez J.M., Hung C.F., Lin H.K., Ma H., Moore M., Palackal N., Ratnam K. (2000). Human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J.*, Oct 1;351(Pt 1):67-77.
- Perusquía M., Hernández R., Morales M.A., Campos M.G., Villalón C.M. (1996). Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol.*, Jan;27(1):181-5.
- Perusquía M., Villalón C.M. (1999). Possible role of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the vasodilating effect of 5 $\beta$ -dihydrotestosterone in rat aorta. *Eur J Pharmacol.*, Apr 29;371(2-3):169-78.
- Perusquía M. (2001). Nongenomic action of steroids in myometrial contractility. *Endocrine*, Jun;15(1):63-72.

- Perusquía, M., Villalón, C.M. (2002). The vasodepressor effect of androgens in pithed rats: potential role of calcium channels. *Steroids*, Dec;67(13-14):1021-8.
- Perusquía M. (2003). Androgen-induced vasorelaxation: a potential vascular protective effect. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*, Apr;111(2):55-59.
- Perusquía M., Navarrete E., Jasso-Kamel J., Montaña L.M. (2005). Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a nongenomic action on L- type calcium channels. *Biol Reprod.*, Aug;73(2):214-21.
- Perusquía, M., Navarrete, E., González, L., Villalón, C. M. (2007). The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery. *Life Sci.*, Sep 1;81(12):993-1002.
- Perusquía, M., Stallone, J.N. (2010). Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, May;298(5):H1301-7.
- Perusquía, M., Espinoza, J., Montaña, L.M., Stallone, J.N. (2012). Regional differences in the vasorelaxing effects of testosterone and its 5-reduced metabolites in the canine vasculature. *Vascul. Pharmacol.*, Mar-Apr;56(3-4):176-82.
- Perusquía, M., Greenway, C.D., Perkins, L.M., Stallone, J.N. (2015). Systemic hypotensive effects of testosterone are androgen structure-specific and neuronal nitric oxide synthase-dependent. *Am. J. Physiol.*, Jul 15;309(2):R189-95.
- Perusquía M., Herrera N., Ferrer M., Stallone J.N. (2017). Antihypertensive effects of androgens in conscious, spontaneously hypertensive rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, Mar;167:106-114.
- Phillips G.B., Jing T.Y., Resnick L.M., Barbagallo M., Laragh J.H., Sealey J.E. (1993). Sex hormones and hemostatic risk factors for coronary heart disease in men with hypertension. *J Hypertens.*, Jul;11(7):699-702.
- Phillips G.B., Pinkernell B.H., Jing T.Y. (1994). The association of hypotestosteronemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb.*, May;14(5):701-6.
- Pi M., Parrill A.L., Quarles L.D. (2010). GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. *J Biol Chem.*, Dec 17;285(51):39953-64.
- Pongkan, W., Chattipakorn, S.C., Chattipakorn, N. (2016). Roles of Testosterone Replacement in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, Jan;21(1):27-43.
- Puttabyatappa Y., Stallone J.N., Ergul A., El-Remessy A.B., Kumar S., Black S., Johnson M., Owen M.P., White R.E. (2013). Peroxynitrite mediates testosterone-induced vasodilation of microvascular resistance vessels. *J Pharmacol Exp Ther.*, Apr;345(1):7-14.

- 
- Reckelhoff J.F., Zhang H., Granger J.P. (1998). Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, Jan;31(1 Pt 2):435-9.
- Reckelhoff J.F., Zhang H., Srivastava K. (2000). Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, Jan;35(1 Pt 2):480-3.
- Remie R., Van Rossum J.X., Coppes R.P., Zaagsma J. (1992). Dysfunctional presynaptic  $\alpha$  2-adrenoceptors expose facilitatory  $\beta$  2-adrenoceptors in the vasculature of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.*, Feb 11;211(2):257-61.
- Riccio A., Esposito E., Eboli M.L. (1996). Modulation by protein kinase C of nitric oxide and cyclic GMP formation in cultured cerebellar granule cells. *Brain Res.*, Apr 29;718(1-2):159-64.
- Rodrigo E., Maeso R., Muñoz-García R., Navarro-Cid J., Ruilope L.M., Cachofeiro V., Lahera V. (1997). Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: consequences of chronic treatment with losartan or captopril. *J Hypertens.*, Jun;15(6):613-8.
- Rouver W.N., Delgado N.T., Menezes J.B., Santos R.L., Moyses M.R. (2015). Testosterone replacement therapy prevents alterations of coronary vascular reactivity caused by hormone deficiency Induced by castration. *PLoS One*, Aug 31;10(8):e0137111.
- Rowell K.O., Hall J., Pugh P.J., Jones T.H., Channer K.S., Jones R.D. (2009). Testosterone acts as an efficacious vasodilator in isolated human pulmonary arteries and veins: evidence for a biphasic effect at physiological and supra-physiological concentrations. *J Endocrinol Invest.*, Oct;32(9):718-23.
- Roy A.K., Lavrovsky Y., Song C.S., Chen S., Jung M.H., Velu N.K., Bi B.Y., Chatterjee B. (1999). Regulation of androgen action. *Vitam Horm.*, 55:309-52.
- Ruige J.B., Ouwens D.M., Kaufman J.M. Beneficial and adverse effects of testosterone on the cardiovascular system in men. (2013). *J Clin Endocrinol Metab.*, Nov;98(11):4300-10.
- Sagredo A., del Campo L., Martorell A., Navarro R., Martín M. C., Blanco-Rivero J., Mercedes F. (2013). Ovariectomy increases the participation of hyperpolarizing mechanisms in the relaxation of rat aorta. *PLoS One*, Sep 13;8(9):e73474.
- Sánchez-Ferrer C.F., Marín J. (1990). Endothelium-derived contractile factors. *Gen Pharmacol.*, 21(5):589-603.
- Sastre E., Balfagón G., Revuelta-López E., Aller M.Á., Nava M.P., Arias J., Blanco-Rivero J. (2012). Effect of short- and long-term portal hypertension



- on adrenergic, nitrgergic and sensory functioning in rat mesenteric artery. Clin Sci (Lond)., Apr;122(7):337-48.
- Sastre E., Caracuel L., Prieto I., Ll  venes P., Aller M.  ., Arias J., Balfag  n G., Blanco-Rivero J. (2016). Decompensated liver cirrhosis and neural regulation of mesenteric vascular tone in rats: role of sympathetic, nitrgergic and sensory innervations. Sci Rep., Aug 3;6:31076.
- Scragg J.L., Jones R.D., Channer K.S., Jones T.H., Peers C. (2004). Testosterone is a potent inhibitor of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Biochem Biophys Res Commun., May 28;318(2):503-6.
- Scragg J.L., Dallas M.L., Peers C. (2007). Molecular requirements for L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockade by testosterone. Cell Calcium, Jul;42(1):11-5.
- Sharma R., Oni O.A., Gupta K., Chen G., Sharma M., Dawn B., Sharma R., Parashara D., Savin V.J., Ambrose J.A., Barua R.S. (2015). Normalization of testosterone level is associated with reduced incidence of myocardial infarction and mortality in men. Eur Heart J., Oct 21;36(40):2706-15.
- Simon, D., Charles, M.A., Nahoul, K., Orssaud, G., Kremiski, J., Hully, V., Joubert, E., Papoz, L., Eschwege, E. (1997). Association between plasma total testosterone and cardiovascular risk factors in healthy adult men: the Telecom Study. J Clin Endocrinol Metab., Feb;82(2):682-5.
- Smith A.M., Bennett R.T., Jones T.H., Cowen M.E., Channer K.S., Jones R.D. (2008). Characterization of the vasodilatory action of testosterone in the human pulmonary circulation. Vasc Health Risk Manag., 4(6):1459-66.
- Stephens N., Bund S.J., Jagger C., Heagerty A.M. (1991). Arterial neuroeffector responses in early and mature spontaneously hypertensive rats. Hypertension, Nov;18(5):674-82.
- Suematsu E., Hirata M., Hashimoto T., Kuriyama H. (1984). Inositol 1,4,5-triphosphate release  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular store sites in single cells of porcine coronary artery. Biochem Biophys Res Commun., Apr 30;120(2):481-5.
- Sun C., Chen M., Mao J. Wang X. (2001). Biphasic effects of orchidectomy on calcitonin generelated peptide synthesis and release. Neuroreport., Nov 16;12(16):3497-502.
- Svartberg J., von M  hlen D., Schirmer H., Barrett-Connor E., Sundfjord J., Jorde R. (2004). Association of endogenous testosterone with blood pressure and left ventricular mass in men. The Troms   Study. Eur J Endocrinol., Jan;150(1):65-71.
- Tabernero A., Giraldo J., Vivas N.M., Badia A., Vila E. (1996). Endothelial modulation of  $\alpha_1$ - adrenoceptor contractile responses in the tail artery of spontaneously hypertensive rats. Br J Pharmacol., Oct;119(4):765-71.

- 
- Tanaka N., Nejime N., Kagota S., Kubota Y., Nakamura K., Kunitomo M., Hashimoto M., Yamamoto R., Shinozuka K. (2004). Dysfunction of purinergic regulation of sympathetic neurotransmission in SHR/NDmcr-cp (SHR-cp) rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, Dec;31 Suppl 2:S60-1.
- Tang J.A., Xu D., Yuan Q.X., Meng Z.H., Cheng F.R., Chen M.Z., Liu G.Z., Liu L.S., Zhang Z.K. (1989). Calcitonin gene-related peptide in the pathogenesis and treatment of hypertension. *Chin Med J (Engl.)*, Dec;102(12):897-901.
- Taraborrelli S. (2015). Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, Nov;94 Suppl 161:8-16.
- Tatchum-Talom R., Eyster K.M., Kost C.K. Jr, Martin D.S. (2011). Blood pressure and mesenteric vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats 7 months after gonadectomy. *J Cardiovasc Pharmacol.*, Mar;57(3):357-64.
- Teoh H., Quan A., Man R.Y. (2000). Acute impairment of relaxation by low levels of testosterone in porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res.*, Mar;45(4):1010-8.
- Tep-areenan P., Kendall D.A., Randall M.D. (2002). Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol.*, Feb;135(3):735-40.
- Toran-Allerand C.D. (2005). Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol. *Ann NY Acad Sci.*, Jun;1052:136-44.
- Traish A.M., Guay A., Feeley R., Saad F. (2009). The dark side of testosterone deficiency: I. Metabolic syndrome and erectile dysfunction. *J Androl.*, Jan-Feb;30(1):10-22.
- Tsuda K., Kuchii M., Kusuyama Y., Hano T., Nishio I., Masuyama Y. (1984). Neurotransmitter release and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Jap. Circ. J.*, Nov;48(11):1263-9.
- Vila E., Tabernero A., Ivorra M.D. (1993). Inositol phosphate formation and contractile response linked to  $\alpha_1$ -adrenoceptor in tail artery and aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J Cardiovasc Pharmacol.*, Aug;22(2):191- 7.
- Villalpando D.M., Navarro R., Del Campo L., Largo C., Muñoz D., Tabernero M., Baeza R., Otero C., García H.S., Ferrer M. (2015). Effect of Dietary Docosahexaenoic Acid Supplementation on the Participation of Vasodilator Factors in Aorta from Orchidectomized Rats. *PLoS One*, Nov 5;10(11):e0142039.
- Wali F.A., Greenidge E. (1989). Evidence that ATP and noradrenaline are released during electrical field stimulation of the rat isolated seminal vesicle. *Pharmacol Res.*, Jul-Aug;21(4):397-404.

- Walker W. H. (2003). Nongenomic actions of androgen in Sertoli cells. *Curr Top Dev Biol.*, 56, 25–53.
- Wang Y., Kaminski N.E., Wang D.H. (2005). VR1-mediated depressor effects during high-salt intake: role of anandamide. *Hypertension*, Oct;46(4):986-91.
- Wang C., Jackson G., Jones T.H., Matsumoto A.M., Nehra A., Perelman M.A., Swerdloff R.S., Traish A., Zitzmann M., Cunningham G. (2011). Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, Jul;34(7):1669-75.
- Wang X., Zhang Y., Bu J., Shen L., He B. (2012). Effects of testosterone on norepinephrine release in isolated rat heart. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.*, Feb;32(1):42-6.
- Watanabe S., Matsumoto T., Ando M., Adachi T., Kobayashi S., Iguchi M., Takeuchi M., Taguchi K., Kobayashi T. (2016). Multiple activation mechanisms of serotonin-mediated contraction in the carotid arteries obtained from spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch.*, Jul;468(7):1271-82.
- Webb C.M., McNeill J.G., Hayward C.S., de Zeigler D., Collins P. (1999). Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation*, Oct 19;100(16):1690-6.
- Westfall T.C., Meldrum M.J., Carpentier S., Naes L., Zhang S.Q. (1987). Alterations in the release of norepinephrine at the vascular neuroeffector junction in hypertension. *Blood Vessels*, 24(3):94-9.
- White R.E. (2002). Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol.*, Feb;38(2):73-80.
- Xu D., Wang X.A., Wang J.P., Yuan Q.X., Fiscus R.R., Chang J.K., Tang J.A. (1989). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Peptides*, Mar-Apr;10(2):309-12.
- Yallampalli C., Kondapaka S.B., Lanlua P., Wimalawansa S.J., Gangula P.R. (2004). Female sex steroid hormones and pregnancy regulate receptors for calcitonin gene-related peptide in rat mesenteric arteries, but not in aorta. *Biol Reprod.*, Apr;70(4):1055-62.
- Yang L., Gao Y.J., Lee R.M. (2004). Quinapril effects on resistance artery structure and function in hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, Dec;370(6):444-51.
- Yildiz O., Seyrek M. (2007). Vasodilating mechanisms of testosterone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*, Jan;115(1):1-6.

- 
- Yogi A., Callera G.E., Antunes T.T., Tostes R.C., Touyz R.M. (2011). Transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) cation channels, magnesium and the vascular system in hypertension. *Circ J.*, 75(2):237-45.
- Yorek M.A., Coppey L.J., Gellett J.S., Davidson E.P., Bing X., Lund D.D., Dillon J.S. (2002). Effect of treatment of diabetic rats with dehydroepiandrosterone on vascular and neural function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, Nov;283(5):E1067-75.
- Yue P., Chatterjee K., Beale C., Poole-Wilson P.A., Collins P. (1995). Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation*, Feb 15;91(4):1154-60.
- Zhao J., Harada N., Okajima K. (2011). Dihydrotestosterone inhibits hair growth in mice by inhibiting insulin-like growth factor-I production in dermal papillae. *Growth Horm IGF Res.*, Oct;21(5):260-7.

## **LIBROS**

Clark MA, Harvey RA, Finkel R, Rey JA, Whalen K. Pharmacology. US: Lippincott Williams & Wilkins. 2011.



## ***X. ANEXO***







## Vasoactive androgens: Vasorelaxing effects and their potential regulation of blood pressure

Lucía Isidoro<sup>a,b</sup>, Mercedes Ferrer<sup>a</sup>, and Mercedes Perusquía<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; <sup>b</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

### ABSTRACT

**Background:** Testosterone, 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -dihydrotestosterone (-DHT) induce an acute *in vitro* vasorelaxation and *in vivo* vasodepressor, hypotensive and antihypertensive responses. Our aim was to study whether androgen-induced blood pressure (BP) reduction is involved with a blockade of Ca<sup>2+</sup> influx through L-type voltage-operated calcium channels (L-VOCCs) and/or the signaling pathways of  $\alpha_1$ -adrenoceptors to induce vasoconstriction, which are one of the major mechanisms of BP maintenance. **Materials and Methods:** The relaxing potency and efficacy of each androgen in large conduit (thoracic aorta) and resistance (mesenteric) arteries from male hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats were established. Blood vessels were isometrically recorded and precontracted with KCl or phenylephrine (Phe). **Results:** Androgens induced concentration-dependent vasorelaxation in precontracted arteries from SHR and WKY rats. 5 $\beta$ -DHT was always the most potent vasorelaxant in arteries from SHR. The KCl-induced contraction resulted significantly more sensitive to androgen-induced vasorelaxation than the Phe-induced contraction. On Phe-induced contraction, 5 $\beta$ -DHT was more potent in the mesenteric artery than in the thoracic aorta. **Conclusions:** The vasorelaxation induced by androgens is mainly mediated by blocking L-VOCCs and in lesser extent by the blockade of multiple signaling pathways operative during  $\alpha$ -adrenoceptor-induced vasoconstriction. 5 $\beta$ -DHT regulates vascular resistance and BP by mainly acting in the mesenteric arterial bed, which may explain its outstanding antihypertensive response previously reported.

### ARTICLE HISTORY

Received 30 October 2017  
 Revised 2 February 2018  
 Accepted 28 February 2018

### KEYWORDS

5 $\beta$ -dihydrotestosterone;  
 hypertension; nongenomic  
 action; testosterone;  
 vasorelaxation

## Introduction

The regulation of the cardiovascular system by male sex steroids (androgens) is now gaining recognition. Particularly, the rapid non-genomic vasorelaxing effect of androgens in isolated blood vessels from several species has recently been studied extensively<sup>1–4</sup>, but only to a very limited extent *in vivo*.<sup>5–7</sup> Remarkably, regulation of blood pressure (BP) is expected as a consequence of androgen-induced vasorelaxation.

In animal studies *in vivo* we have previously reported that androgens are capable of blocking the vasopressor responses to noradrenaline or a Ca<sup>2+</sup> channel agonist in anesthetized vagosympathectomized, pithed Wistar male rats.<sup>8</sup> Androgens also induce a marked reduction of BP in conscious normotensive Sprague-Dawley and Testicular feminized male (Tfm) rats.<sup>9</sup> Remarkably, androgens can also

elicit a significant antihypertensive response in conscious hypertensive male rats (SHR), and testosterone (TES) deprivation by orchidectomy increases BP in normotensive rats.<sup>10</sup> Taken together these findings have suggested the importance of androgens as physiological modulators of the BP.

Of particular interest is that these are structurally specific effects of the androgen molecule due to the fact that their potency and efficacy to provoke those effects is different for each androgen, thus we have identified that the 5 $\beta$ -reduced metabolite of TES, 5 $\beta$ -dihydrotestosterone (5 $\beta$ -DHT), is the most potent androgen to induce: (i) vasorelaxation<sup>1,3,11–14</sup>; and (ii) reduction on systemic BP<sup>9,10</sup> while its epimer, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (5 $\alpha$ -DHT), is less effective, and even less effective than TES, the precursor of both 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -DHT.

**CONTACT** Mercedes Perusquía  [perusqui@unam.mx](mailto:perusqui@unam.mx)  Department of Cell Biology and Physiology, Institute for Biomedical Research, National Autonomous University of Mexico (UNAM), P.O. Box: 70228, Mexico City; Mercedes Ferrer  [mercedes.ferrer@uam.es](mailto:mercedes.ferrer@uam.es)  Department of Physiology, Faculty of Medicine, Autonomous University of Madrid (UAM), Arzobispo Morcillo, 4, 28029, Madrid, Spain.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at [www.tandfonline.com/ierc](http://www.tandfonline.com/ierc).

© 2018 Taylor & Francis

On the other hand, hypertension is a global public health problem and is one of the major causes of premature death worldwide. Therefore, the contribution to the knowledge of the regulation of the BP, as well as the development of new antihypertensive treatments, is very valuable and merits continued investigation. Based on that the mesenteric arterial network receives 25% of cardiac output and contributes substantially to the total peripheral resistance, and therefore to arterial BP<sup>15</sup>, we hypothesized that the outstanding antihypertensive response mediated by androgens may act more substantially on resistance blood vessels. Therefore, the present study was designed to analyze, for the first time, the *in vitro* vasorelaxing effects of TES in contrast to its non-aromatizable 5-reduced dihydrometabolites (5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -DHT) in both resistance and large conduit arteries, mesenteric artery (MA) and thoracic aorta (TA) respectively, from hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. Likewise, the underlying mechanism of action was studied. Since calcium influx via voltage-operated L-type Ca<sup>2+</sup> channels (L-VOCCs) and sympathetic vasoconstriction via  $\alpha_1$ -adrenoceptors contribute to BP regulation<sup>16–18</sup>, the role of L-VOCCs and  $\alpha_1$ -adrenoceptors in the vasorelaxing effects of TES, 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -DHT was also examined.

## Materials and methods

### Animals

Male (SHR or WKY) rats, 18–21 weeks old were obtained from the Animal Centre of the Institute of Cellular Physiology, National Autonomous University of Mexico (UNAM) and from the Animal Facility of the Universidad Autónoma de Madrid (UAM) (Registration number EX-021U). Animals received humane care in compliance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institute of Health (NIH publication 86–26, revised 2014) and by the European Union directives 63/2010 UE and Spanish regulation RD53/2013. Experimental protocols were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the Institute for Biomedical Research, UNAM, and by the Research Ethics Committee of the UAM according to directives 609/86 CEE and R.

D. 233/88 of the *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación* of Spain (PROEX 202/16).

### Vascular tissue preparation and contractile force measurement *in vitro*

After mild anesthesia with ether, the rats were killed by cervical dislocation and their descending TA and MA were then quickly removed and placed in a Krebs-Henseleit solution with the following composition (mM): NaHCO<sub>3</sub> 24.9, NaCl 119, KCl 4.74, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.18, CaCl<sub>2</sub> 2.5 and glucose 12.0 (pH 7.4, 37°C) and constantly oxygenated (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 95:5). These blood vessels were then carefully cleaned of blood and adhering adipose and connective tissues and the midthoracic region of the TA was cut into rings of ~1 cm in length and MA was cut into rings of ~0.5 cm.

The TA and MA rings were: (i) suspended horizontally between two stainless steel wires; and (ii) bathed in individual 5-ml tissue chambers filled with Krebs-Henseleit solution at 37°C and constantly oxygenated (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 95:5). One wire was attached to a fixed support at the bottom of the chamber and the other to an isometric force transducer (FTO3C; Grass Instrument, Quincy, MA, USA) and recorded on a polygraph (79; Grass Instrument, Quincy, MA, USA). The resting tension was adjusted to 1 g (10 mN) for TA and to 0.5 g (5 mN) for MA, which depends on the different caliber of each blood vessel. TA and MA rings that developed a tension of less than 1 g were discarded. Rings were equilibrated for 1.5–2 h before conducting the experiments.

The vasocontractile response to high potassium (KCl 60 mM) solution (Krebs-Henseleit solution with an equimolar substitution of 60 mM KCl and 64.7 mM NaCl) was induced. KCl caused a tonic contraction, in both TA and MA rings, which was repeated twice in order to verify the reproducibility of the response. After each KCl-induced contraction, the tissues were washed with normal Krebs-Henseleit solution (re-polarized).

The contribution of endothelium in the mechanisms of vasorelaxing action of TES is still controversial. Several lines of experimental evidence have demonstrated that TES-induced vasorelaxation is an endothelium-independent mechanism<sup>3,19,20</sup>, in the present study we used preparations with

endothelium; as result, beside nitric oxide, other endothelial factors could also play a modulator role in  $\alpha_1$ -adrenoceptor- and depolarization-mediated responses in endothelium intact vessels and denudation could contribute the lack of those contraction.<sup>21</sup> Thus, the presence of endothelium in both TA and MA was pharmacologically determined when 20  $\mu$ M acetylcholine (ACh) induced an endothelium-dependent vascular relaxation on 1  $\mu$ M phenylephrine (Phe)-induced contraction. Only vascular rings in which the relaxation to ACh was greater than 70% were used as preparations with intact endothelium. Immediately, vascular rings were then washed three times with Krebs-Henseleit solution to re-equilibrate for 60 min, and then 60 mM KCl or 1  $\mu$ M Phe, which is the optimal concentration to maintain a stable contraction tone for at least 70 min, were added in different rings from either SHR or WKY rats. After a stable contractile tension was attained (~15 min), TES, 5 $\alpha$ -DHT or 5 $\beta$ -DHT were added independently at different concentrations (0.1, 1.0, 10, and 100  $\mu$ M) in a cumulative manner. In a separate group of experiments (vehicle control group), in other TA or MA rings, KCl- or Phe-induced contraction were recorded during exposure to the vehicle of androgen (absolute ethanol; ETOH) i.e., equivalent ETOH volume for each androgen concentration tested, which never exceeded 0.1% v/v given cumulatively. The effect of each androgen or their vehicle was determined every 15 min (required time to reach a stable vasorelaxing effect) during 70 min in samples from each individual ( $n \geq 6$  rats in independent experiments). Finally, the rings were washed to re-equilibrate for 60 min before inducing a last contraction to KCl, which was recorded during 40 min. Only one treatment was made in each experiment, which means that the resulting concentration-response curve to each androgen was determined independently in samples from different animals.

The concentration-response curves were individually plotted, and the inhibitory concentration 50 ( $IC_{50}$ ; value for androgen concentration at which 50% of inhibition of the maximum vasocontractile response was achieved), and the maximal relaxing effect ( $E_{max}$ ; relaxing effect of androgen at the highest concentration tested, 100  $\mu$ M) for each androgen were calculated as described in previous studies.<sup>8,12–14,19</sup> Finally, the

effect of each androgen on KCl- and Phe-induced contraction was compared as follows in both TA and MA of both SHR and WKY rats.

#### Group 1

Concentration-response curves for each androgen were compared in both MA and TA from SHR to WKY rats, and their vasorelaxing potency ( $IC_{50}$ ) were obtained in both KCl- and Phe-induced contraction. Sensitivity of KCl- and Phe-induced contraction to androgen-induced relaxation was also compared by using the relaxing efficacy ( $E_{max}$ ) of each androgens in subgroups a and b from both SHR and WKY rats.

#### Group 2

In different blood vessels rings from different animals, the vehicle control group (equivalent ETOH volume for each androgen concentration) was studied in MA and TA precontracted with KCl or Phe in both rat strains.

#### Data presentation and statistical analysis

All data in this work are expressed as percentage of inhibition to the contraction induced by KCl or Phe and evaluated by comparing the amplitude of the contraction before (control 100%) and 15 min after addition of each androgen concentration (% of relaxation). The non-paired Student's *t*-test was used to compare the response between two groups. The concentration-response curves were compared by means of a two-way ANOVA. The relative potency ( $IC_{50}$ ) was calculated from  $IC_{50}$  values by the formula:  $IC_{50} \text{ TES}/IC_{50} \text{ androgen}$  assuming a value of 1.0 to TES. Similarly, the relative efficacy was obtained from  $E_{max}$  values by the formula:  $E_{max} \text{ androgen}/E_{max} \text{ TES}$ , assuming a value of 1.0 to TES. To compare  $IC_{50}$  and  $E_{max}$  between groups, a one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was used. Each "n" value corresponds to a different animal. Data along the manuscript and figures are expressed by means  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

#### Drugs and chemicals

With the exception of 5 $\beta$ -dihydrotestosterone (5 $\beta$ -DHT; 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstan-3-one) from

Steraloids (Newport, RI, U.S.A.), the remained compounds were purchased from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) and included: Testosterone (TES; 17 $\beta$ -hydroxy-4-andosten-3-one), 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (5 $\alpha$ -DHT; 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-one), phenylephrine hydrochloride (Phe) and acetylcholine chloride (ACh). The androgens were separately prepared as stock solution in absolute ethanol and then diluted in absolute ethanol to the concentration needed for each experiment; final ethanol concentration in the tissue baths never exceeded 0.1% (v/v) of vehicle. The remaining drugs were dissolved in distilled water. Phe was kept in the dark until use in order to avoid light-induced degradation.

## Results

### **Androgen-induced vasorelaxation in both large conduit artery and resistance artery precontracted with different contractile agents**

Addition of each androgen, TES and its 5-reduced metabolites, to precontracted TA and MA by both contractile agents in hypertensive and normotensive rats resulted in a concentration-dependent relaxation whereas the vehicle control (ETOH) did not significantly modify the contraction induced by KCl or Phe (Figure 1, 2). The concentration-response curve to each androgen was significantly different from the curve of ETOH ( $p < 0.01$ ; Figure 1, 2). We observed a total recovery of tone and amplitude of the last contraction to KCl in both blood vessels after washing the tissue and removing the androgen; thus, their vasorelaxing effects are evidently reversible (data not shown).

### **Comparison of the vasorelaxing potency of each androgen**

The analysis of these curves (Figure 1, 2) indicated that the vasorelaxing potency was different for each androgen and dependent on the contractile agent, IC<sub>50</sub> values are shown in the concentration-response curves and the relative potency in Table 1. Remarkably, WKY rats were less sensitive to androgen-induced vasorelaxation than in SHR only in Phe-precontracted TA rings which means that the vasorelaxing effect of androgens was significantly

higher in hypertensive rats than in normotensive rats ( $p < 0.0001$ ). In general, androgens were more potent to elicit relaxation on KCl-induced contraction than on Phe-induced contraction of TA (Figure 1AC, 2AC) but no differences were found in MA (Figure 1BD, 2BD). Regarding the SHR, 5 $\beta$ -DHT was more potent and efficient in Phe- than in KCl-precontracted MA (Figure 1D, 3) but no such a difference was found in the case of TES and 5 $\alpha$ -DHT (Figure 1C, 3). It is important to note that, although IC<sub>50</sub> values for 5 $\beta$ -DHT in MA precontracted with KCl or Phe are not statistically different, 5 $\beta$ -DHT at 0.1 and 1  $\mu$ M exhibited a greater vasorelaxing effect in Phe-precontracted MA from SHR than in KCl-precontracted arteries (Figure 1BD).

### **Differences between structural conformation of androgens and their vasorelaxing effects**

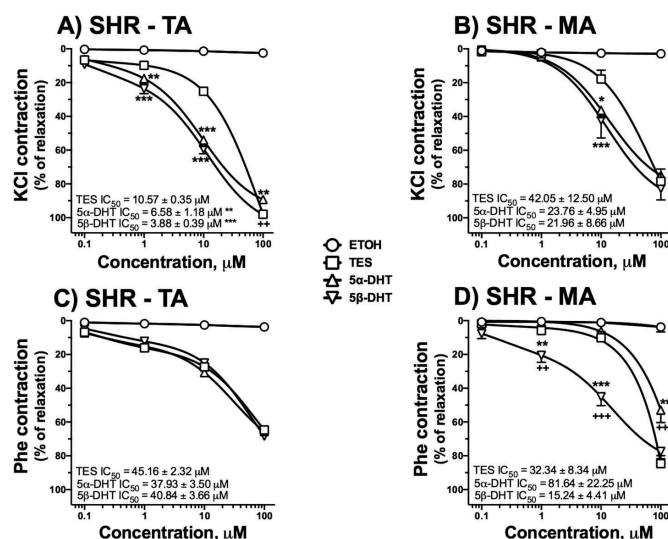
The potency and efficacy of each androgen to inhibit the two different contractions was dependent on the structural conformation of each androgen; thus, A/B *cis* epimer (5 $\beta$ -configured), 5 $\beta$ -DHT was markedly more potent than TES and 5 $\alpha$ -DHT (Table 1).

## Discussion

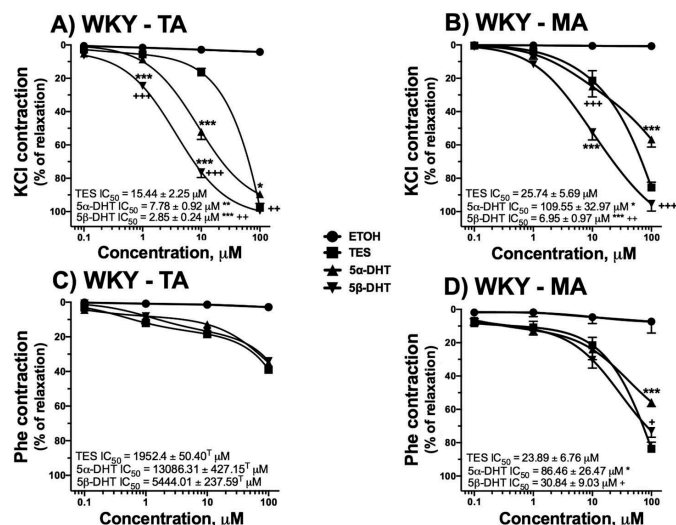
### **General**

To our knowledge no studies have examined the mechanism of the novel antihypertensive responses of TES and its 5-reduced metabolites.<sup>10</sup> Remarkably, we highlighted that the non-aromatizable androgen, 5 $\beta$ -DHT which is devoid of androgenic actions possesses a strong antihypertensive response. Likewise, in the current study, we observed that this 5 $\beta$ -reduced androgen is acting to block both extracellular Ca<sup>2+</sup> entry and intracellular Ca<sup>2+</sup> release; hence, it has potential as a lead androgen that could be optimized and developed into a clinical candidate to prevent hypertension in men with androgen deprivation therapy in patients with prostate cancer, but also in hypogonadal men.

In this study, we found that the three tested androgens elicited an immediate vasorelaxation in both large conduit and resistance arteries. Numerous studies have shown that the vasorelaxation elicited by androgens is a non-genomic action



**Figure 1.** Vasorelaxing effect induced by androgens in isolated blood vessels of hypertensive rats (SHR). Concentration-response curves to testosterone (TES), 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -dihydrotestosterone (-DHT). A) and C) thoracic aorta (TA) and B) and D) mesenteric artery (MA) rings precontracted with A) and C) 60 mM KCl or B) and D) 1  $\mu$ M phenylephrine (Phe). Each symbol represents the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 6$ ). Inhibitory concentration 50 ( $IC_{50}$ ) values are also showed. Statistical significances: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with TES; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with its isomer.



**Figure 2.** Vasorelaxing effect induced by androgens in isolated blood vessels of normotensive (WKY) rats. Concentration-response curves to testosterone (TES), 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -dihydrotestosterone (DHT). A) and C) thoracic aorta (TA) and B) and D) mesenteric artery (MA) rings precontracted with A) and C) 60 mM KCl or B) and D) 1  $\mu$ M phenylephrine (Phe). Each symbol represents the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 6$ ). Inhibitory concentration 50 ( $IC_{50}$ ) values are also showed. Statistical significances: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with TES; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with its isomer.

**Table 1.** Relative potency and efficacy values of androgen-induced vasorelaxation on KCl- and Phe-precontracted isolated thoracic aorta (TA) and mesenteric artery (MA) from SHR and WKY rats.

Strain-blood vessel	Contractile agent	Potency ratio*			Efficacy ratio <sup>†</sup>		
		TES	5 $\alpha$ -DHT	5 $\beta$ -DHT	TES	5 $\alpha$ -DHT	5 $\beta$ -DHT
SHR-TA	KCl	1.00	1.60	2.72	1.00	0.91	1.00
	Phe	1.00	1.19	1.10	1.00	1.01	1.05
WKY-TA	KCl	1.00	1.98	5.43	1.00	0.91	1.01
	Phe	1.00	0.15	0.36	1.00	0.89	0.87
SHR-MA	KCl	1.00	1.76	1.91	1.00	0.95	1.05
	Phe	1.00	0.39	2.12	1.00	0.62	0.91
WKY-MA	KCl	1.00	0.23	3.70	1.00	0.66	1.11
	Phe	1.00	0.40	0.77	1.00	0.66	0.87

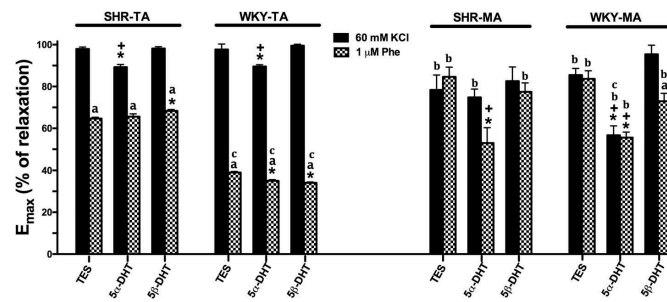
\*Potency ratio was calculated from IC<sub>50</sub> by the formula: IC<sub>50</sub> TES/IC<sub>50</sub> metabolite assuming a value of 1.00 to TES. <sup>†</sup>Efficacy ratio of each blood vessel was calculated from E<sub>max</sub> by the formula: E<sub>max</sub> metabolite/E<sub>max</sub> TES assuming a value of 1.00 to TES.

that is not mediated by classic intracellular androgen receptor and gene transcription.<sup>1,3,22,23</sup> This characteristic was validated in the present study by the fact that the androgens induced a rapid vasorelaxation in onset (~2 min) and the relaxation disappeared after the androgen was removed from the tissue.

The three androgens induced a stronger vasodilation in SHR (hypertensive rats) than in WKY (normotensive rats), this result is in agreement with the

earlier findings of Honda and co-workers<sup>24</sup>, who reported that TES-induced vasorelaxation in the isolated aorta was greater in SHR than WKY rats. A very recent work from our research team also reported that TES, 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -DHT produced marked reductions in BP in conscious SHR and lesser but significant reductions in BP in their normotensive counterparts (WKY rats), and the simplest interpretation is that a greater protective compensatory response is done in normotensive (WKY) as compared to hypertensive (SHR) rats.<sup>10</sup> On the other hand, with the exception of 5 $\beta$ -DHT on Phe-induced contraction in MA of SHR, no difference was found with the relaxing potency of the remaining androgens on Phe contraction in both blood vessels ( $p > 0.05$ ). This result may explain the marked antihypertensive response of 5 $\beta$ -DHT reported previously.<sup>10</sup> Likewise, Phe-precontracted MA resulted more sensitive to androgen-induced vasorelaxation than TA in both SHR and WKY. Therefore, it is tempting to suggest that the present study provides, for the first time, new evidence that 5 $\beta$ -DHT, and in lesser extent TES and 5 $\alpha$ -DHT, elicit an antihypertensive response by acting directly and strongly in resistance vascular bed.

Acceptably, it has been reported that TES relaxes some resistance blood vessels such as prostatic, pulmonary, subcutaneous<sup>23,25–27</sup> and mesenteric arterial bed.<sup>28</sup> Nevertheless, to our knowledge, this is the first report where the 5-reduced metabolites of TES were evaluated and compared in both types of blood vessels. Notably, androgen-induced vasorelaxation



**Figure 3.** Androgen-induced vasorelaxation in isolated blood vessels of hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. Maximal relaxing effect (E<sub>max</sub> at 100  $\mu$ M) of androgens precontracted thoracic aorta (TA) or mesenteric artery (MA) rings by KCl or Phe. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 6$ ). Statistical significances: \* $p < 0.05$  compared with TES; † $p < 0.05$  compared with its isomer; ‡ $p < 0.05$  compared with TES; § $p < 0.05$  compared with KCl; ¶ $p < 0.05$  compared with TA; †† $p < 0.05$  compared with SHR.



was observed at supra-physiological ( $\mu\text{M}$ ) concentrations in our *in vitro* system which may be explained by the hydrophobic nature of all steroids, and the *in vitro* assay is limited when using non-polar steroids, the effect of which can only be detected at high concentrations.

#### **Mechanism(s) of androgen-induced vasorelaxation to produce an antihypertensive response**

Androgens were capable of inducing vasorelaxation in both KCl- and Phe- induced contraction. Based on these findings, it is important to keep in mind that these two vasoconstrictors are agents of different nature i.e., the contractile response generated by different agents such as KCl or Phe, may each be dependent upon different mechanisms of contraction; for instance, extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry *versus* intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release. In this respect, it has been widely recognized that membrane depolarization by high KCl is known to stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  entry from extracellular space, mainly through L-VOCCs, to induce sustained smooth muscle contraction; whereas, the contractile response generated by Phe has been shown to stimulate both  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum and  $\text{Ca}^{2+}$  influx from the extracellular medium.<sup>29–33</sup> Indeed, it has been shown that one of the mechanisms of the tonic contraction following  $\alpha_1$ -adrenoceptor activation with Phe is mediated by  $\text{Ca}^{2+}$  influx through nifedipine-sensitive L-VOCCs.<sup>34</sup> Regarding the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release by an agonist-induced vasoconstriction, such as Phe is known to be activated by phospholipase C, an enzyme that causes the breakdown of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) and 1,2-diacylglycerol.<sup>32</sup> IP3 stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores and causes a transient increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ <sup>35,36</sup>, whereas, 1,2-diacylglycerol activates protein kinase C.<sup>37</sup>

In hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats, our findings indicate that the three androgens are more potent to relax KCl than Phe contraction in TA, suggesting a preferential blockade on L-VOCCs in large conduit blood vessels. Moreover, the ability of androgens to induce vasorelaxation on Phe contraction also strongly confirms a blockade of  $\text{Ca}^{2+}$  influx through

nifedipine-sensitive L-VOCC, in addition to inhibit intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release. However, on Phe contraction their potency revealed several differences: (i) in SHR, the highest potency of  $5\beta$ -DHT was observed in MA while the highest potency of  $5\alpha$ -DHT was observed in TA; (ii) in normotensive (WKY) rats, TES and  $5\beta$ -DHT were more potent in MA than TA, and the effect, if any, of the three androgen was negligible in TA. These results suggest that  $5\beta$ -DHT is acting to block both extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, although the effect of  $5\beta$ -DHT on the latter seems to be of great relevance in hypertension, as indicated by the increased relative potency in Phe-precontracted MA from SHR (2.12 times more potent than TES) compared to that obtained from WKY (0.77 times less potent than TES). Additionally, it should be noted that  $5\beta$ -DHT at 0.1 and 1  $\mu\text{M}$  exhibited a greater vasorelaxing effect in Phe-precontracted MA from SHR than in KCl-precontracted arteries. These differences show the ability of  $5\beta$ -DHT to relax precontracted-MA in response to sympathetic vasoconstriction, particularly when hypertension exists, and may explain its marked antihypertensive response recently documented.<sup>10</sup> In general, the simple interpretation of our results is that the three androgens had different preferential site of action. With respect to the reduction of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by androgens, the activation of  $\text{K}^+$  channels by androgens in isolated blood vessels has also been supported by Yildiz and coworkers<sup>38–42</sup> as well as reviewed by Perusquía and Stallone.<sup>3</sup>

Our present findings are in line with previous electrophysiological studies in some smooth muscle cells, where different androgens are capable of: (i) diminishing KCl-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increment in single cell, and; (ii) inactivating L-VOCCs.<sup>13,43–47</sup>

It can be concluded that the mechanism of the vasorelaxing action of the different androgens is not entirely similar and additional mechanisms may be involved in its vascular effects. The regulation of BP by androgens must imply the activation of multiple signaling pathways beyond activation of  $\alpha$ -adrenoceptors, particularly inhibiting L-VOCCs as well as probably also non-L-VOCCs.<sup>19,38,48–50</sup> It is also important to consider that in the mesenteric arterial bed, the sympathetic vasoconstriction plays a crucial role in the maintenance of peripheral

resistance through the release of different neurotransmitters.<sup>51</sup> Indeed, we cannot rule out that the vasorelaxing effects of androgens may also reflect changes in neurotransmitters release, similarly to that described for non-neurogenic cellular mediators (e.g. thromboxane, prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub>).<sup>52–54</sup> Based on this consideration, studies are in progress in our laboratories to evaluate this potential effect of androgens. In addition, these mechanistic insights should be incorporated into the analysis of the cause of hypertension.

It is important to highlight that the capacity of vascular smooth muscle for androgen metabolism has not been investigated at molecular level but the function of active 5 $\beta$ -reduced metabolites acting as vasoactive steroids strongly suggests that the vascular smooth muscle may be a specific intracrine target tissue that possesses the appropriate physiological enzymatic machinery.

#### **Chemical structure-vasorelaxing effects relationship**

Our results obtained with 5 $\beta$ -DHT demonstrate that its vasorelaxing potency and efficacy (see Table 1) is even more powerful than TES and its epimer 5 $\alpha$ -DHT in large conduit and resistance blood vessels. The analysis of their structural conformation shows that TES or its 5 $\alpha$ -reduction exhibit a planar structure with an A/B *trans* ring-junction. In contrast, its 5 $\beta$ -epimer (5 $\beta$ -DHT) exhibits a 90° bend at the A/B ring junction forming a *cis*-configuration. This different spatial orientation of the hydrogen at C<sub>5</sub> appears to result in a highest potency and efficacy to induce vasorelaxation. Consistent with the present observation, our previous functional studies have also shown that 5 $\beta$ -DHT exhibits the greater vasorelaxing potency and efficacy.<sup>3,12,14</sup>

#### **Clinical implications and remarks**

Since orchidectomy develops high BP in Wistar and WKY rats<sup>10</sup>, androgens deficiency may contribute to hypertension in males, these findings in experimental animals correlate well with a recent clinical study with long-term TES therapy for up to 8 years that produced marked and sustained gradual

decreases in systolic and diastolic BP in men with hypogonadism associated with elevated BP.<sup>55</sup>

Accordingly, the present findings could provide a better understanding on the control of BP by androgens, and should be taken into account in more clinic studies that are currently investigating androgen replacement therapy in older men. Collectively, our study supports a role for male sex steroids in modulating hypertension in the SHR. Androgens also appear to influence contractile pathways. There appears to be selectivity in these effects since not all constrictors were affected equally. This selectivity of response suggests that further understanding of the sites and mechanisms of action of androgens in these pathways may offer opportunities for future drug development. Furthermore, the 5 $\beta$ -DHT property of not bioconverting to estrogens i.e., without estrogenic effects as well as without androgenic action plus its outstanding vasorelaxing action point to this androgen as an excellent candidate for the control of hypertension.

#### **Acknowledgments**

L. Isidoro is a PhD student in M. Perusquia and M. Ferrer laboratories, who is registered in a double PhD program agreement between Universidad Nacional Autónoma de México and Universidad Autónoma de Madrid (Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM and Doctorado en Biociencias Moleculares, UAM). She was supported by fellowship from CONACYT (616802/330085) and Cátedra Isaac Costero from Grupo UAM-Santander. The authors thank Dr. Claudia V. Rivera and Mr. David Muñoz Directors of the Animal Facility at the Instituto de Fisiología Celular (UNAM) and Facultad de Medicina (UAM), respectively.

#### **Funding**

This study was supported by grants from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-UNAM (PAPIIT), grant number IN203815 to M. Perusquia, and from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI1100406), Comunidad de Madrid (S2013/ABI-2783, "INSPIRA1-CM") and Fondo Europeo de Desarrollo Regional to M. Ferrer.

#### **Declaration of interest**

The authors report no conflicts of interest.



## References

- Perusquia M. Androgen-induced vasorelaxation: a potential vascular protective effect. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003;111:55–59.
- Yildiz O, Seyrek M. Vasodilating mechanisms of testosterone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007;115:1–6.
- Perusquia M, Stallone JN. Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298:1301–1307.
- Kelly DM, Jones TH. Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *J Endocrinol*. 2013;217:47–71.
- Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, et al. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation*. 1996;94:2614–2619.
- Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, De Zeigler D, Collins P. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation*. 1999;100:1690–1696.
- Ong PJ, Patrizi G, Chong WC, Webb CM, Hayward CS, Collins P. Testosterone enhances flow-mediated brachial artery reactivity in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2000;85:269–272.
- Perusquia M, Villalón CM. The vasodepressor effect of androgens in pithed rats: potential role of calcium channels. *Steroids*. 2002;67:1021–1028.
- Perusquia M, Greenway CD, Perkins LM, Stallone JN. Systemic hypotensive effects of testosterone are androgen structure-specific and neuronal nitric oxide synthase-dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;309:189–195.
- Perusquia M, Herrera N, Ferrer M, Stallone JN. Antihypertensive effects of androgens in conscious, spontaneously hypertensive rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017;167:106–114.
- Perusquia M, Villalón CM. Possible role of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the vasodilating effect of 5 $\beta$ -dihydrotestosterone in rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 1999;371:169–178.
- Perusquia M, Navarrete E, González L, Villalón CM. The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery. *Life Sci*. 2007;81:993–1002.
- Montaño LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V, Perusquia M. Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity, and 5 $\beta$ -dihydrotestosterone restricted to L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockade. *Endocrinology*. 2008;149:2517–2526.
- Perusquia M, Espinoza J, Montaño LM, Stallone JN. Regional differences in the vasorelaxing effects of testosterone and its 5-reduced metabolites in the canine vasculature. *Vasc Pharmacol*. 2012;56:176–182.
- Christensen KL, Mulvany MJ. Mesenteric arcade arteries contribute substantially to vascular resistance in conscious rats. *J Vasc Res*. 1993;30:73–79.
- Vanhoutte PM, Verbeuren TJ, Webb RC. Local modulation of adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *Physiol Rev*. 1981;61:151–247.
- Nelson MT, Standen NB, Brayden JE, Worley JF. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature*. 1988;336:382–385.
- Hütri-Kähönen N, Kähönen M, Wu X, et al. Control of vascular tone in isolated mesenteric arterial segments from hypertensive patients. *Br J Pharmacol*. 1999;127:1735–1743.
- Perusquia M, Hernández R, Morales MA, et al. Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol*. 1996;27:181–185.
- Jones RD, Pugh PJ, Hall J, et al. Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse. *Eur J Endocrinol*. 2003;148:111–120.
- Sanchez-Ferrer CF, Marin J. Endothelium-derived contractile factors. *Gen Pharmacol*. 1990;21:589–603.
- Yue P, Chatterjee K, Beale C, et al. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation*. 1995;91:1154–1160.
- Jones RD, English KM, Pugh PJ, Morice AH, Jones TH, Channer KS. Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonist action. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:814–823.
- Honda H, Unemoto T, Kogo H. Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;34:1232–1236.
- Malkin CJ, Jones RD, Jones TH, et al. Effect of testosterone on ex vivo vascular reactivity in man. *Clin Sci (Lond)*. 2006;111:265–274.
- Navarro-Dorado J, Orensanz LM, Recio P, et al. Mechanisms involved in testosterone-induced vasodilation in pig prostatic small arteries. *Life Sci*. 2008;83:569–573.
- Rowell KO, Hall J, Pugh PJ, et al. Testosterone acts as an efficacious vasodilator in isolated human pulmonary arteries and veins: evidence for a biphasic effect at physiological and supra-physiological concentrations. *J Endocrinol Invest*. 2009;32:718–723.
- Tep-Areenan P, Kendall DA, Randall MD. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol*. 2002;135:735–740.
- Khalil RA, Van Breemen C. Sustained contraction of vascular smooth muscle: calcium influx or C-kinase activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;244:537–542.
- Bhugra P, Gulati OD. Interaction of calcium channel blockers with different antagonists in aorta from normal and diseased rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 1996;40:109–119.
- Otani H, Otani H, Das DK.  $\alpha_1$ -Adrenoceptor-mediated phosphoinositide breakdown and inotropic response in

- rat left ventricular papillary muscles. *Circ Res*. 1988;62:8–17.
32. Damron DS, Kanaya N, Homma Y, et al. Role of PKC, tyrosine kinases, and Rho kinase in alpha-adrenoreceptor-mediated PASM contraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283:1051–1064.
  33. De Witt BJ, Kaye AD, Ibrahim IN, et al. Effects of PKC isozyme inhibitors on constrictor responses in the feline pulmonary vascular bed. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:50–57.
  34. Nishimura K, Ota M, Ito K. Existence of two components in the tonic contraction of rat aorta mediated by  $\alpha_1$ -adrenoceptor activation. *Br J Pharmacol*. 1991;102:215–221.
  35. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*. 1984;312:315–321.
  36. Suematsu E, Hirata M, Hashimoto T, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate release  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular store sites in single cells of porcine coronary artery. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;120:481–485.
  37. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 1992;258:607–614.
  38. Yildiz O, Seyrek M, Gul H, et al. Testosterone relaxes human internal mammary artery in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;45:580–585.
  39. Yildiz O, Seyrek M, Un I, et al. The relationship between risk factors and testosterone-induced relaxations in human internal mammary artery. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;45:4–7.
  40. Seyrek M, Yildiz O, Ulusoy HB, et al. Testosterone relaxes isolated human radial artery by potassium channel opening action. *J Pharmacol Sci*. 2007;103:309–316.
  41. Yildiz O, Seyrek M, Irkilata HC, et al. Testosterone might cause relaxation of human corpus cavernosum by potassium channel opening action. *Urology*. 2009;74:229–232.
  42. Seyrek M, Irkilata HC, Vural IM, et al. Testosterone relaxes human internal spermatic vein through potassium channel opening action. *Urology*. 2011;78:233.e1–5.
  43. Scragg JL, Jones RD, Channer KS, et al. Testosterone is a potent inhibitor 1320 of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318:503–506.
  44. Perusquía M, Navarrete E, Jasso-Kamel J, et al. Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a nongenomic action on L-type calcium channels. *Biol Reprod*. 2005;73:214–221.
  45. Hall J, Jones RD, Jones TH, et al. Selective inhibition of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology*. 2006;147:2675–2680.
  46. Scragg JL, Dallas ML, Peers C. Molecular requirements for L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockade by testosterone. *Cell Calcium*. 2007;42:11–15.
  47. Flores-Soto E, Reyes-García J, Carbajal-García A, et al. Sex steroids effects on guinea pig airway smooth muscle tone and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  basal levels. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;439:444–456.
  48. Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, et al. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:1720–1727.
  49. Tsang S, Wong SS, Wu S, et al. Testosterone-augmented contractile responses to  $\alpha_1$ - and  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;296:C766–82.
  50. Hsu JC, Cheng CC, Kao YH, et al. Testosterone regulates cardiac calcium homeostasis with enhanced ryanodine receptor 2 expression through activation of TGF- $\beta$ . *Int J Cardiol*. 2015;190:11–14.
  51. Hirst GD, Edwards FR. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev*. 1989;69:546–604.
  52. Blanco-Rivero J, Balfagón G, Ferrer M. Orchidectomy modulates  $\alpha_2$ -adrenoceptor reactivity in rat mesenteric artery through increased thromboxane  $\text{A}_2$  formation. *J Vasc Res*. 2006;43:101–108.
  53. Martorell A, Blanco-Rivero J, Aras-López R, et al. Orchidectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in the acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta. *Cardiovasc Res*. 2008;77:590–599.
  54. Del Campo M, Sagredo A, Del Campo L, et al. Time-dependent effect of orchidectomy on vascular nitric oxide and thromboxane  $\text{A}_2$  release. Functional implications to control cell proliferation through activation of the epidermal growth factor receptor. *PLoS One*. 2014;9(7):e102523.
  55. Haider A, Yassin A, Haider KS, et al. Men with testosterone deficiency and a history of cardiovascular diseases benefit from long-term testosterone therapy: observational, real-life data from a registry study. *Vasc Health Risk Manag*. 2016;12:251–261.